

Technická univerzita v Liberci

Ústav zdravotnických studií
Biomedicínská technika

VLIV MAGNETICKÉHO POLE NA BAKTERIÁLNÍ BIOFILM

THE EFFECT OF MAGNETIC FIELD ON BACTERIAL
BIOFILM

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

studijní program: B 3944 Biomedicínská technika

studijní obor: 3901R032 Biomedicínská technika

TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI

Ústav zdravotnických studií

Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martina Bohatá**
Osobní číslo: **Z10000002**
Studijní program: **B3944 Biomedicínská technika**
Studijní obor: **Biomedicínská technika**
Název tématu: **Vliv magnetického pole na bakteriální biofilm**
Zadávající katedra: **Ústav zdravotnických studií**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznámení se s problematikou (elektro)magnetického pole a vypracování potřebné teorie.
2. Zpracování rešerše na téma možnosti (elektro)magnetického pole v biologii (vliv na mikroorganismy).
3. Zpracování metodiky měření a vyhodnocení vzorků, které jsou ovlivňovány (elektro)magnetickým polem.
4. Provozování laboratorního modelu s reálnými mikroorganismy (měření fyzikálních a chemických parametrů).
5. Zhodnocení dosažených výsledků včetně popisu využití v reálné praxi.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

50 - 70 stran

Forma zpracování bakalářské práce:

tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

viz příloha

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Lucie Křiklavová

Ústav nových technologií a aplikované informatiky

Datum zadání bakalářské práce:

31. března 2012

Termín odevzdání bakalářské práce:

30. dubna 2013

prof. Dr. Ing. Zdeněk Kůs
rektor



Mgr. Marie Froňková
pověřena vedením ústavu

V Liberci dne 29. března 2013

Příloha zadání bakalářské práce

Seznam odborné literatury:

- [1] BROŽ, Jaromír. Elektřina a magnetismus I.. 1.vyd. Praha : SPN. 232 s.
- [2] BUREŠ, Jan. PETRÁŇ, Mojmír. ZACHAR, Jozef. Electrophysiological methods in biological research. 1. vyd. Praha : ČSAV, 1960. 515 s.
- [3] CAREY, Roberta. SCHUSTER, Mindy. MCGOWAN, Karin. Lékařská mikrobiologie v klinických případech. 1.vyd. Praha : Triton, 2011. 321 s. ISBN 978-80-7387-480-3
- [4] HAŇKA, Ladislav. Teorie elektromagnetického pole. 2. přeprac.vyd. Praha: SNTL, 1982. 218 s. ISBN 0450682
- [5] KALLA, Daniel. Bakterie. 1. Vyd. Ostrava : Domino, 2006. 334 s. ISBN 80-7303-323-2
- [6] KAPRÁLEK, František. Základy bakteriologie. 1. vyd. Praha : Karolinum, 1999. 241 s. ISBN 80-7184-811-5
- [7] KATO, M. Electromagnetics in Biology, Springer 2006, ISBN-13 978-4-431-27913-6.
- [8] KITTNAR, Erik. CHALOUPECKÝ, Vladimír. HEJZLAR, Miroslav. Základy lékařské mikrobiologie : Bakteriální metabolismus - Kultivace bakterií - Genetika bakterií a virů. 1. vyd. Praha : SNTL, 1986. 114 s.
- [9] KNEPPO, L'udovít. Magnetické pole. 1.vyd. Bratislava : Slovenské vydav. technickej literatúry, 1955. 159 s.
- [10] MYSLÍK, Jiří. Elektromagnetické pole : základy teorie. 1. vyd. Praha : BEN, 1998. 159 s. ISBN 80-86056-43-0
- [11] PHARMA-REPORTS. Klinicky významné bakterie. 1. Vyd. Praha : Triton, 2012. 123 s. ISBN 978-80-7387-588-6
- [12] RULÍK, M. a kol. Mikrobiální biofilmy. 1. vyd. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. 447 s. ISBN 978-80-244-2747-8
- [13] RYŠKOVÁ, Olga. Základy lékařské mikrobiologie a imunologie. 1. vyd. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2007. 130 s. ISBN 80-246-0135-4
- [14] SEDLÁK, Bedřich, ŠTOLL, Ivan. Elektřina a magnetismus. 2.vyd. Praha: ACADEMIA, 2002. 632 s. ISBN 80-200-1004-1.
- [15] SMÉKAL, Petr. Teorie elektromagnetického pole. 1. vyd. Ostrava : Pedagog. fak., 1988. 276 s.

Prohlášení

Byla jsem seznámena s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědoma povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím bakalářské práce a konzultantem.

Datum: 25.4.2013

Podpis:



Poděkování:

Děkuji Ing. Lucii Křiklavové za vedení mé bakalářské práce, za cenné rady, věcné připomínky a podněty, Ing. Martinu Truhlářovi, Ph.D. za pomoc a připomínky v oblasti magnetického pole. Velké díky patří Ing. Barboře Kracíkové za pomoc v laboratoři, ochotu a trpělivost, Michaele Andělové za korekturu a morální podporu, stejně tak i Lucii Novotné. Special thanks to Sezer Binat. V neposlední řadě děkuji celé své rodině za podporu.

Balucha

Anotace:

BOHATÁ, MARTINA. *Vliv magnetického pole na bakteriální biofilm*, Ing. Lucie Křiklavová, Liberec: Ústav zdravotnických studií, Technická univerzita v Liberci, 2013, 57 s., 5 příloh, Bakalářská práce

Cílem této bakalářské práce je pozorovat vliv magnetického pole na bakteriální biofilm. Práce se zabývá působením magnetického pole, vytvořeným permanentními magnety, na dva druhy mikrobiálních biofilmů, a to bakterie *Micrococcus luteus* a bakterie *Escherichia coli*. Dále je cílem se, na základě provedených experimentů, pokusit zhodnotit rozdíly v působení na gram pozitivní/negativní bakterie, a také určit rozdíly ve schopnosti tvořit biofilm na různých typech povrchů, případně zhodnotit účinky magnetického pole na změnu adhezivity bakteriálních buněk.

Klíčová slova: Magnetické pole, bakteriální biofilm, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, permanentní magnety

Abstract:

BOHATÁ, MARTINA. *The effect of magnetic field on bacterial biofilm*, Ing. Lucie Křiklavová, Liberec: Institute of Health Studies, Technical University of Liberec, 2013, 57 pp., 5 attachments, Bachelor Degree Thesis

The aim of this bachelor thesis is to observe the effect of magnetic field on bacterial biofilm. The thesis deals with the effect of the magnetic field generated by permanent magnets, on the two types of microbial biofilms, namely bacteria *Micrococcus luteus* and bacteria *Escherichia coli*. It is also the aim to, pursuant on performed experiments, trying to evaluate the differences in activity per gram positive/negative bacteria, and also to determine the differences in the ability to form biofilms on different types of surfaces, or to evaluate the effects of magnetic fields to change the adhesivity of the bacterial cells.

Key words: Magnetic field, bacterial biofilm, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli*, permanent magnets

Obsah

Seznam obrázků, tabulek a grafů	8
Seznam zkratk a symbolů	9
1 Úvod	10
2 Magnetické pole	11
2.1 Základní pojmy	11
2.2 Stacionární magnetické pole	13
2.3 Kvazistacionární magnetické pole	15
2.4 Elektromagnetické vlny	16
2.5 Magnetické vlastnosti látek	16
3 Bakterie.....	19
3.1 Struktura buňky	19
3.1.1 Buněčná stěna.....	19
3.1.2 Cytoplazmatická membrána	20
3.1.3 Cytoplazma a vnitřní struktury	20
3.1.4 Bičíky a fimbrie.....	21
3.2 Metabolismus bakterií	21
3.3 Mikrobiální biofilm	22
3.3.1 Vznik biofilmu.....	23
3.3.2 Růst biofilmu	24
3.3.3 Stavba biofilmu.....	24
4 Využití (elektro)magnetického pole v biologii.....	26
5 Použité magnetické pole	30
5.1 Zvolená metoda	30
5.2 Použitý přípravek.....	30
5.3 Měření indukce	31
6 Použité bakterie	33
6.1 Micrococcus luteus	33
6.2 Escherichia coli.....	35
7 Použité materiály a metody.....	38
7.1 Izolace a pomnožení bakterií	38
7.2 Vytvoření inokula	40
7.3 Vlastní experiment s magnetickým polem.....	40
7.4 Použité nosiče	43
8 Vyhodnocení.....	45
8.1 Zpracování vzorků	45
8.2 Výsledky	46
9 Závěr	52
Soupis bibliografických citací.....	54

Seznam příloh	57
Příloha A.....	i
1. Graf pro teflonový nosič, M. luteus.....	i
2. Graf pro marprene nosič, M. luteus.....	i
3. Graf pro tenký silikonový nosič, M. luteus	ii
4. Graf pro tlustý silikonový nosič, M. luteus	ii
Příloha B.....	iii
1. Graf pro teflonový nosič, E. coli	iii
2. Graf pro marprene nosič, E. coli	iii
3. Graf pro tenký silikonový nosič, E. coli.....	iv
4. Graf pro tlustý silikonový nosič, E. coli.....	iv
Příloha C.....	v
1. Fotografie z mikroskopu, M. luteus, teflonový nosič.....	v
2. Fotografie z mikroskopu, M. luteus, marprene nosič	v
3. Fotografie z mikroskopu, M. luteus, tenký silikonový nosič	vi
4. Fotografie z mikroskopu, M. luteus, tlustý silikonový nosič	vi
Příloha D.....	vii
1. Fotografie z mikroskopu, E. coli, teflonový nosič	vii
2. Fotografie z mikroskopu, E. coli, marprene nosič.....	vii
3. Fotografie z mikroskopu, E. coli, tenký silikonový nosič	viii
4. Fotografie z mikroskopu, E. coli, tlustý silikonový nosič	viii
Příloha E.....	ix
1. Fotografie – vzorky M. luteus	ix
2. Fotografie – průběh ředění vzorků	ix
3. Fotografie – ukázka počítání KTJ	x
4. Fotografie – průběh vyhodnocování vzorků.....	x

Seznam obrázků, tabulek a grafů

Obrázek 1 – Poyntingův vektor.....	16
Obrázek 2 - Fáze vývoje biofilmu.....	24
Obrázek 3 - Počítačová simulace magnetického pole.....	30
Obrázek 4 - Kovová podkova s magnety	31
Obrázek 5 - Způsob použití přípravků při experimentu	32
Obrázek 6 - <i>Micrococcus luteus</i> rozočkovaný na Petriho misce.....	34
Obrázek 7 - <i>M. luteus</i> vyfocený elektronovým mikroskopem.....	34
Obrázek 8 - <i>E. coli</i> na Petriho misce.....	36
Obrázek 9 - <i>E.coli</i> vyfocena elektronovým mikroskopem.....	37
Obrázek 10 - Rozočkování na kultivační půdu	39
Obrázek 11 - Nastříhané nosiče	41
Obrázek 12 - Způsob uložení vzorku do magnetu	42
Obrázek 13 - Použité hadičky	44
Obrázek 14 - Biofilm <i>E. coli</i> pod mikroskopem	50
Obrázek 15 - Biofilm <i>M. luteus</i> pod mikroskopem	51
Tabulka 1 - Vzorky <i>Micrococcus luteus</i>	46
Tabulka 2 - Vzorky <i>Escherichia coli</i>	46
Graf 1 - <i>M. luteus</i> - slepý vzorek	47
Graf 2- <i>M. luteus</i> - vzorek z magnetu	47
Graf 3 - <i>M. luteus</i> - porovnání slepého vzorku a vzorku z magnetu.....	47
Graf 4 - <i>E. coli</i> - slepý vzorek	48
Graf 5 - <i>E. coli</i> - vzorek z magnetu.....	49
Graf 6 - <i>E. coli</i> - porovnání slepého vzorku a vzorku z magnetu.....	49

Seznam zkratek a symbolů

Symbol	Veličina	Jednotka
H	magnetická indukce	T
l	délka	m
α	úhel	°
F	síla	N
v	rychlost	m/s
ρ	hustota volného náboje	C/m ³
I	elektrický proud	A
S	plocha	m ²
t	čas	s
E	intenzita elektrického pole	V·m ⁻¹
Φ	magnetický indukční tok	WB
D	elektrická indukce	C/m ²
Q	celkový náboj	C
B	magnetická indukce	T
J	moment setrvačnosti	kg.m ²
μ_0	permeabilita vakua	H.m ⁻¹
π	číselná konstanta	-
F _m	magnetická síla	N
Ψ	tok elektrické intenzity	V.m
r	poloměr	m
ε_F	indukované elektromotorické napětí	V
RNA	ribonukleová kyselina	-
DNA	deoxyribonukleová kyselina	-
EPS	extracelulární polymerní substance	-
KTJ	kolonie tvořící jednotky	-

1 Úvod

Tématem této práce je vliv magnetického pole na bakteriální biofilm. Magnetické pole nabízí širokou škálu využití. S jeho projevy se běžně setkáváme každý den, a to v různých typech elektronických karet, nosičů dat, v počítačové technice a navigaci. Magnetismus najdeme také ve zdravotnictví, výzkumných laboratořích a ve strojírenském průmyslu. V neposlední řadě má své vlastní magnetické pole každý živý organismus, počínaje samotnou buňkou. Za jeden velký magnet by se dalo považovat i magnetické pole planety Země, které ovlivňuje mnoho procesů. V současné době tedy existuje nespočet možností využití magnetického pole a jeho účinků na živé i neživé látky. Výzkum magnetického pole a hledání dalších způsobů jeho využití neustále pokračuje. V teoretické části práce tedy nejdříve představím samotné magnetické pole, v praktické části poté námi použité magnetické pole.

Také bakteriálnímu biofilmu je v současné době věnována značná pozornost. Jelikož bakterie mají tendenci přisedat a tvořit biofilm na nejrůznějších površích, mohou tak způsobovat různé znečištění, koroze, či být původci infekcí. Tyto infekce mohou být obtížněji odstranitelné, jelikož biofilm poskytuje bakteriím ochranu a lepší podmínky pro růst. Bude proto vypracována potřebná teorie o bakteriích a bakteriálních biofilmech, dále bude vypracována rešerše na téma doposud známého využití magnetického pole v biologii.

Hlavním úkolem této práce bude na základě provedených experimentů zhodnotit, jaký vliv má magnetické pole na mikrobiální biofilmy. Tímto výzkumem se budu zabývat v praktické části práce, kde navážu na výzkum ohledně vlivu magnetického pole na bakterie, který byl proveden v loňském roce v rámci bakalářské práce *Vliv magnetického pole na mikroorganismy*. Já se ve svém experimentu zaměřím, tentokrát ne na jednotlivé bakterie, ale na bakteriální biofilm. V prostorách mikrobiologické laboratoře TUL se pokusím vytvořit biofilm z bakterií rodu *Escherichia coli* a biofilm z bakterií rodu *Micrococcus luteus*. Biofilm budu vytvářet na několika typech povrchů, které byly pro tento experiment vybrány. Následně se pokusím zhodnotit, zda má magnetické pole vliv na biofilm, zda lze říci, že je rozdíl mezi těmito dvěma druhy bakterií, lišící se Gram pozitivitou/negativitou, a také, zda záleží na materiálu nosiče, na kterém je biofilm uchycen.

2 Magnetické pole

2.1 Základní pojmy

Magnet – látka, která okolo sebe vytváří magnetické pole. Existují dva druhy magnetů: permanentní magnety, které nepotřebují ke vzniku svého pole žádné další okolnosti, dají se vyrobit zmagnetováním; nebo elektromagnety, jejichž magnetické pole v jejich okolí vzniká protékajícím elektrickým proudem ve vodiči, čím je tento proud větší, tím větší získáváme magnetické pole okolo vodiče. Magnety mají dva póly: záporný je označován jako severní (značíme N, podle anglického north, červeně) a kladný jako jižní (značíme S, podle anglického south, modře).

Elektromagnetické pole – skládá se ze dvou navzájem neoddělitelných polí – magnetického a elektrického. Má svou energii a je schopno konat práci. Popisujeme ho pomocí Maxwellových rovnic.

Maxwellovy rovnice – rovnice popisující elektromagnetické pole. Popisují vztah mezi jeho magnetickou a elektrickou složkou. Lze je zapsat v diferenciálním nebo integrálním tvaru. V diferenciálním tvaru popisují chování pole v bodě, v integrálním tvaru popisují jeho chování v oblasti. Maxwellovy rovnice (MR) v integrálním tvaru vypadají následovně:

$$\begin{array}{ll} 1. \text{MR} : \oint_C \mathbf{H} \cdot d\mathbf{l} = I + \frac{d\Psi}{dt} & 3. \text{MR} : \oint_S \mathbf{D} \cdot d\mathbf{S} = Q \\ 2. \text{MR} : \oint_C \mathbf{E} \cdot d\mathbf{l} = -\frac{d\Phi}{dt} & 4. \text{MR} : \oint_S \mathbf{B} \cdot d\mathbf{S} = 0 \end{array} \quad [1]$$

Maxwellovy rovnice v diferenciálním tvaru pak:

$$\begin{array}{ll} 1. \text{MR} : \text{rot} \mathbf{H} = \mathbf{J} & 3. \text{MR} : \text{div} \mathbf{D} = \rho \\ 2. \text{MR} : \text{rot} \mathbf{E} = 0 & 4. \text{MR} : \text{div} \mathbf{B} = 0 \end{array} \quad [2]$$

1. Maxwellova rovnice říká, že proud vyvolává okolo sebe magnetické pole, které je nejsilnější v místě nejbližší k protékajícímu proudu a se vzdáleností se zeslabuje.

2. Maxwellova rovnice říká, že změna magnetického pole vyvolává elektrické pole. Nazýváme jí také jako Faradayův indukční zákon.

3. Maxwellova rovnice, nebo také Gaussova věta, říká, že čím je více náboje v objemu, tím je větší energie.

4. Maxwellova rovnice, nebo také zákon spojitosti indukčního toku, je závislý na 1. Maxwellově rovnici. Říká, že magnetický indukční tok v uzavřené orientované ploše je nulový. To znamená, že magnetické pole nemá žádný náboj.

Magnetické pole – je součástí elektromagnetického pole. Vzniká okolo předmětů, jimiž protéká proud (u permanentních magnetů, který tento proud pro vznik magnetického pole nepotřebují, vzniká magnetické pole na základě vázaných elektrických proudů uvnitř objektu). Toto pole je popisováno fyzikálními veličinami magnetická indukce a intenzita magnetického pole.

Magnetické indukce – vektorová fyzikální veličina, popisující magnetické pole. Popisuje jeho silové účinky na nabitě částice, které se nachází v tomto magnetickém poli. Její vzorec je:

$$\mathbf{B} = \frac{\mathbf{F}}{Q \cdot \mathbf{v}}$$

Magnetický indukční tok – vyjadřuje hustotu magnetické indukce na určitou plochu, přitom platí, že čím více indukčních čar prochází plochou, tím větší je velikost magnetického toku. Platí vztah:

$$\Phi = \int_S \mathbf{B} \cdot d\mathbf{S}$$

Intenzita magnetického pole – vektorová fyzikální veličina, popisující magnetické pole. Popisuje intenzitu pole, která závisí na faktorech, které toto pole vytváří. Nezávisí na okolnostech a prostředí, v němž se toto pole vyskytuje. Následující vztah platí pro prostředí ve vakuu:

$$\mathbf{H} = \frac{\mathbf{B}}{\mu_0}$$

Magnetické indukční čáry – čáry, jimiž graficky znázorňujeme vlastnosti magnetického pole, konkrétně magnetickou indukci. Tečna v daném bodě znázorňuje

směr vektoru magnetické indukce. Magnetické indukční čáry jsou uzavřené a orientované od severního pólu k jižnímu.

Magnetické indukční čáry udávají, kromě směru magnetického pole, také velikost magnetické indukce na daném místě pole. To znázorňuje jejich hustota v daném místě, přičemž platí, že čím je větší hustota indukčních čar, tím je na tomto místě větší indukce magnetického pole. [3]

Homogenní prostředí – veličina, kterou pole popisuje má v každém bodě stejnou hodnotu, pokud tomu tak není, je nehomogenní.

Lineární pole – veličina, kterou pole popisuje je konstantní. Pokud se v čase mění, je pole nelineární.

Izotropní pole – pokud při zjišťování veličiny nezáleží na směru, je pole izotropní. Pokud na směru záleží je pole anizotropní.

Měkké látky – magneticky měkké látky jsou snadno zmagnetizovatelné, ovšem po odstranění vnějšího magnetického pole, jejich vlastní magnetické pole téměř zaniká.

Tvrdé látky – magneticky tvrdé látky po odstranění vnějšího magnetického pole zůstávají zmagnetizovány a stávají se trvalými nebo dočasnými permanentními magnety.

2.2 Stacionární magnetické pole

Pod pojmem stacionární magnetické pole rozumíme takové magnetické pole, jehož vlastnosti se nemění s časem. Vzniká tehdy, pokud je pohyb elektricky nabitých částic rovnoměrný. Vyskytuje se okolo permanentních magnetů se stálou polohou a okolo vodičů, které mají neměnný proud a stálou polohu.

Magnetické pole se projevuje silovými účinky, tedy silou. Velikost magnetické síly, která působí v okolí vodiče, vypočítáme pomocí vzorce:

$$F_m = B \cdot I \cdot l \cdot \sin \alpha$$

Směr magnetické síly určíme pomocí vektoru rychlosti \mathbf{v} , jelikož magnetická síla je kolmá na tento vektor. Zároveň je také kolmá na magnetickou indukci \mathbf{B} . Proto můžeme vzorec pro výpočet magnetické síly zapsat v následujícím tvaru:

$$\mathbf{F}_m = Q(\mathbf{v} \times \mathbf{B})$$

Tímto vzorcem vyjadřujeme působení magnetické síly na náboj o určité rychlosti, velikost této síly je úměrná rychlosti náboje. Tuto sílu nazýváme *Lorentzova síla*. Ta je kolmá k vektoru magnetické indukce a její směr určujeme pomocí pravidla levé ruky: Položíme-li levou ruku tak, aby prsty ukazovaly směr pohybujících se nábojů (kladných) a indukční čáry vstupovaly do dlaně, ukazuje palec směr působící síly. Pro záporné náboje je směr síly opačný. [4]

Tento vzorec platí v případě, že na náboj nepůsobí také elektrické pole. Pokud toto pole působí, je potřeba zohlednit také velikost intenzity elektrického pole. Tato síla je elektromagnetická a vypočítáme ji podle rovnice:

$$\mathbf{F} = Q(\mathbf{E} + \mathbf{v} \times \mathbf{B})$$

Magnetická síla, je síla, která působí v magnetickém poli. Působí na pohybující se tělesa, která nesou libovolný náboj, ale i na všechny druhy látek v klidu. [5] Je tedy zřejmé, že magnetické pole má jisté účinky na všechny částice a látky. Pozorování těchto účinků na živé organismy, konkrétně na bakteriální biofilm dvou různých bakterií, bude předmětem praktické části této práce.

Z výše zmíněného vzorce pro výpočet magnetické síly je zřejmé, že její velikost závisí na tvaru a délce vodiče, okolo kterého vzniká magnetické pole protékajícím proudem. Pro výpočet velikosti magnetické indukce je ale výhodné, pokud umíme určit její velikost v jakémkoliv bodu v okolí tohoto vodiče. K tomu nám slouží Biotův-Savatův zákon, podle kterého lze vypočítat účinek tzv. proudových elementů. Představujeme si, že vodič zanedbatelného průřezu je rozdělen na lineární elementy délky dl , jimiž protéká proud I . [3] Biotův-Savartův zákon nám tedy říká, jaká je velikost magnetické indukce v daném bodě. Vzorec v diferenciálním tvaru vypadá následovně:

$$d\mathbf{B} = \frac{\mu_0 I}{4\pi} \cdot \frac{d\mathbf{l} \times \mathbf{r}}{r^3}$$

Kde μ_0 je permeabilita vakua. Tento vzorec tedy lze použít pro vakuum, ale velmi přibližně i na ostatní látky, kromě látek feromagnetických. Permeabilita ostatních látek se běžně prakticky neliší od μ_0 . [6]

Biotův-Savrtův zákon ovšem neplatí pouze pro magnetickou indukci, platí také pro intenzitu magnetického pole \mathbf{H} . Tento zákon se pro intenzitu pole liší pouze tak, že nepočítá s permeabilitou, z čehož vyplývá, že intenzita \mathbf{H} není závislá na prostředí.

2.3 Kvazistacionární magnetické pole

Již jsme se seznámili se stacionárním magnetickým polem, které je časově neproměnné. Časově proměnné magnetické pole nazýváme polem nestacionárním. Zvláštním případem tohoto pole je pole kvazistacionární. To je pole, které je sice časově proměnné, ale časové změny jsou dostatečně pomalé. Vlna se v obvodu šíří nekonečnou rychlostí, amplituda v celém obvodu a čase je stejná.

Teorie nestacionárního (a kvazistacionárního) pole nám říká, že magnetické pole nevzniká pouze v časově neproměnné soustavě. Zdrojem nestacionárního pole jsou posuvné proudy, vzniká tedy i se změnou elektrického pole v čase. Jak již bylo zmíněno dříve elektrické a magnetické pole tvoří dohromady pole elektromagnetické a tyto jeho dvě složky jsou neoddělitelné. Pokud popisujeme pouze jednu jeho složku, například pole magnetické, je druhá složka minimální a je v úvahách zanedbávána. Elektromagnetické pole je popisováno Maxwellovými rovnicemi, z kterých vyplývá, že toto pole je závislé na časových změnách a na rychlosti těchto změn.

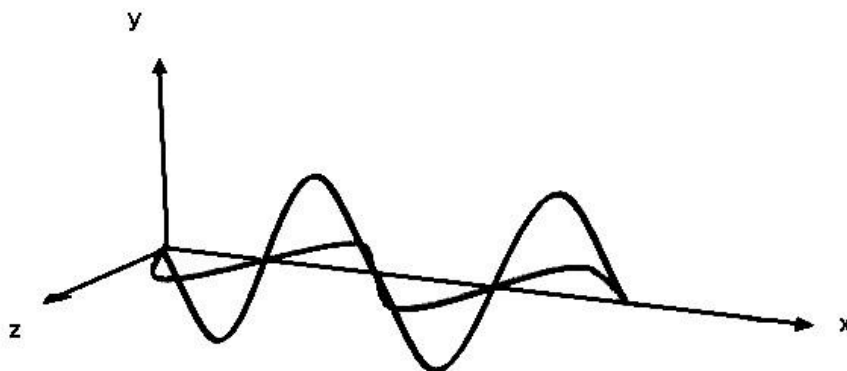
Pro popis kvazistacionárního pole využíváme elektromagnetickou indukci, která byla objevena M. Faradayem, a podle něj je také nazýván zákon elektromagnetické indukce jako Faradayův indukční zákon. Elektromagnetickou indukci lze ověřit několika pokusy, za různých situací. Ty nám říkají, že změna magnetického pole vyvolává indukovaný proud. Pro výpočet indukovaného elektromotorického napětí využíváme Faradayův indukční zákon:

$$\mathcal{E}_F(t) = - \frac{d\Phi}{dt}$$

Pro kvazistacionární pole se nemění Maxwellovy rovnice. Přestože stacionární a kvazistacionární pole jsou popisovány stejnými rovnicemi, působení těchto dvou polí na nabitou částici se liší. Matematický popis těchto dvou polí je tedy stejný, ovšem fyzikální podmínky jsou pro obě odlišné. [5]

2.4 Elektromagnetické vlny

Elektromagnetické pole je podle představ a popisu Maxwellovými rovnicemi v podstatě elektromagnetické vlnění. Elektromagnetické vlny se skládají z vektorů intenzity elektrického pole **E** a intenzity magnetického pole **H**, které jsou na sebe vzájemně kolmé. Zároveň jsou kolmé na směr, jímž se tato vlna šíří v prostředí. Názorně můžeme směr tohoto šíření a rozložení vektorů vidět na Obrázku 1.



Obrázek 1 – Poyntingův vektor [5]

Směr toho šíření nazýváme *Poyntingův vektor*, značíme ho **S** a jeho vztah k intenzitám elektrického a magnetického pole je:

$$\mathbf{S} = \mathbf{E} \times \mathbf{H}$$

Elektromagnetické vlny se chovají podobně jako světelné záření, a proto pro ně platí stejné zákony pro odraz a lom, a vykazují stejné jevy – interferenci, polarizaci, ohyb.

2.5 Magnetické vlastnosti látek

Každá látka, živý organismus a dokonce i jednotlivé molekuly a atomy mají svou magnetickou aktivitu, své magnetické pole a projevují se svými magnetickými účinky a stejně tak reagují a jsou ovlivňovány magnetickým polem ostatních objektů. [7]

U většiny látek, pokud se nevyskytují v magnetickém poli, jsou atomové momenty orientovány chaoticky. Výsledný magnetický moment makroskopického množství takové látky je roven nule. Po vložení do vnějšího magnetického pole začne na tyto atomové magnetické momenty působit moment síly, který je orientuje do směru pole, což způsobí, že látka již nemá nulový makroskopický magnetický moment. Znamená to, že látka je zmagnetována. [5]

Magnetické vlastnosti látek se samozřejmě liší podle typu látky a uspořádání atomů. Magnetické pole působí na atomy tak, že pokud je dostatečně silné, stáčí spin elektronů v atomovém obalu. Látky se mohou v magnetickém poli chovat různě a také mají rozdílné účinky na toto pole. Podle těchto jejich vlastností je dělíme následujícím způsobem.

Diamagnetické látky – v magnetickém poli se jejich výsledný magnetický moment otáčí opačně než je celkový moment pole, proto nepatrně zeslabují sílu tohoto pole. Do této skupiny patří voda, většina plynů, většina kovů a většina organických látek.

Paramagnetické látky – v magnetickém poli se magnetický moment těchto látek orientuje shodně s momentem pole. Pokud tyto látky nejsou v magnetickém poli, neprojevují magnetické vlastnosti. Patří sem například platina, mangan, hořčík, sodík, draslík.

Feromagnetické látky – se v magnetickém poli orientují rovněž ve směru magnetického momentu pole. Dosahují velkých magnetických toků, proto jsou využívány v magnetických obvodech. Z těchto látek lze vytvořit permanentní magnety. Patří sem například železo, nikl, kobalt, různé slitiny.

Jak již bylo zmíněno dříve, magnetismus ovlivňuje všechny látky, včetně mikroorganismů. Magnetické pole o určité síle dokáže změnit stav magnetických vlastností látek a mění tak jejich chování. Takto narušená rovnováha znamená oslabení biologického magnetismu a ztěžuje schopnosti chemikálií adekvátně reagovat v procesech látkové přeměny. [8]

V každé látce se vyskytují elektricky nabitě částice, a proto je každá látka zmagnetizovatelná. Jak velké účinky bude mít vnější magnetické pole na látku či organismus záleží na počtu těchto elektricky nabitých částic. Čím více jich látka obsahuje, tím větší účinky má pole na tuto látku, protože částice se hromadně uspořádají ve směru nebo proti směru působení pole, jak bylo popsáno výše. Pokud látka obsahuje příliš malé množství elektricky nabitých částic, jsou účinky magnetického pole minimální.

Při působení na nabitě částice záleží také samozřejmě na tom, jestli jsou nabitě kladně nebo záporně, a tedy k jakému pólu budou přitahovány. Při biologickém pozorování magnetického pole označujeme póly jako bioseverní a biojižní. Oba póly působí na živou tkáň rozdílně a do značné míry mají opačné účinky než druhý. Biojižní pól působí pozitivně na biologickou činnost, zvyšuje kyselost prostředí, zvyšuje průchodnost krevním řečištěm, urychluje látkovou přeměnu. Bioseverní pól naopak biologickou činnost tlumí, zvyšuje zásaditost prostředí, snižuje průchodnost krevního řečiště a zpomaluje látkovou přeměnu. [9]

Na velikost účinků při aplikování magnetismu má vliv mnoho okolností. Nejdůležitějším faktorem je samozřejmě síla aplikovaného pole, dále záleží na tvaru magnetu, na jeho velikosti a materiálu. Také záleží na tom, jak dlouhou dobu je látka vystavena působení toho pole.

Při experimentech s magnetickým polem je třeba dbát na bezpečnost práce, ať už se jedná o permanentní magnety nebo elektromagnety. Pozor by si měli dávat především lidé s kardiostimulátorem, těhotné ženy a lidé, kteří mají jakoukoliv náhradu vyrobenou z kovu. Při práci je také důležité myslet na to, že magnetické pole může znehodnotit ID karty, diskety, mobilní telefony, hodinky, apod.

3 Bakterie

3.1 Struktura buňky

Bakterie jsou jednobuněčné organismy, jejich tělo je tedy tvořeno pouze jednou buňkou. Tyto buňky jsou, kromě několika výjimek, pevně ohraničeny buněčnou stěnou, pod kterou je cytoplazmatická membrána. Ta je jedinou membránou buňky, jelikož vnitřní orgány nejsou membránami ohraničeny. Skutečnost, že bakterie mají neohraničené jádro, je řadí mezi prokaryotické buňky. Společně s jednobuněčnými organismy zvanými Archea (dříve známé jako archebakterie), jsou jedinými zástupci prokaryot. [10]

Bakterie se rozmnožují příčným dělením. Z mateřské buňky vznikají dvě buňky dceřiné. Ty jsou zcela shodné a nesou stejnou genetickou informaci jako buňka mateřská.

Bakterie mají velikost 0,2-2 μm . [11] Mohou mít tvar tyčinek nebo tvar kulovitý, potom je nazýváme koky. Pro ty je typické, že se shlukují do různých útvarů, například do řetízků (streptokoky), hroznů (stafylokoky), dvojic (diplokoky), tetád (*Micrococcus*) a dalších. Také bakterie ve tvaru tyčinek mohou tvořit tyto shluky, například řetízky, palisády, vějíře, spirály. [12]

3.1.1 Buněčná stěna

Buněčná stěna se vyskytuje téměř u všech bakterií, kromě několika málo výjimek. Obklopuje buňku, drží její tvar, zajišťuje její odolnost, vůči vnějším vlivům a může obsahovat důležité látky, pomocí kterých určujeme charakteristiku bakterií. Těmito látkami jsou lipopolysacharidy a peptidoglykany, pomocí čehož určujeme, zda je bakterie gram-pozitivní či gram-negativní, což je jednou ze základních charakteristik bakterií. Tyto dvě skupiny jsou pojmenovány na základě barvení podle Grama. To se provádí aplikováním Lugolova roztoku a krystalovou violetí. Tato směs se poté vymývá organickým rozpouštědlem.

Gram-pozitivní bakterie mají buněčnou stěnu větší šířky, která obsahuje značné množství peptidoglykanu. Ten se váže na cytoplazmatickou membránu, která je také obalem buňky a nachází se pod buněčnou stěnou. Peptidoglykan je vázán molekulami

kyseliny teichoové a je velmi citlivý na antibiotika. Ta se naváží na enzymy, které tvoří interpeptidové můstky peptidoglykanu, omezí nebo úplně zastaví jejich činnost, což způsobí rozpad stěny. [12] Jak již bylo zmíněno výše, buněčná stěna drží tvar buňky, proto její rozpad znamená také rozpad buňky. Silná stěna gram-pozitivních bakterií nedovoluje přílišné pronikání organického rozpouštědla, proto tyto bakterie zůstávají při barvení podle Grama tmavě modrofialové.

Gram-negativní bakterie mají naopak svou stěnu tenčí, obsahuje méně peptidoglykanu, zato značné množství lipopolysacharidů. Díky malému obsahu peptidoglykanu jsou odolnější vůči antibiotikům. Stěna těchto bakterií umožňuje snadné pronikání organického rozpouštědla, dobře tedy odbarvuje aplikovanou směs a po přebarvení safarinem se zobrazuje se růžově. [12]

3.1.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána je polopropustným obalem buňky, nachází se pod buněčnou stěnou. Je tvořena lipidovou dvojvrstvou a obsahuje proteiny a enzymy. Díky své semipermeabilitě nepropouští velké částice, bílkoviny a nabité ionty, tím udržuje osmotický tlak uvnitř bakteriální buňky. Společně s buněčnou stěnou odděluje cytoplazmu a vnitřní struktury buňky od vnějšího prostředí.

Tato membrána je fluidní (tekutá) a obsahuje bakteriální lipidy. To jsou zvláštní struktury typické pro bakterie, nevyskytují se u eukaryotních organismů. Těchto lipidů existuje mnoho různých druhů, a proto jsou dobře využitelné pro klasifikaci bakterií. [12]

3.1.3 Cytoplazma a vnitřní struktury

Cytoplazma je vnitřní výplň bakteriální buňky. Je zcela obklopena cytoplazmatickou membránou a buněčnou stěnou, nedostává se tedy mimo buňku, pokud nejsou tyto struktury narušeny nežádoucími vlivy. Obsahuje také řadu struktur, které se nachází uvnitř buňky a nejsou od cytoplazmy odděleny membránami. Těmi nejdůležitějšími jsou ribozomy, plazmidy a buněčné jádro.

Ribozomy jsou útvary skládající se z RNA, probíhá zde syntéza bakteriálních bílkovin. [11]

Plazmidy jsou malé útvary složené z DNA, asi 100x menší než DNA obsažená v jádře. [12] Obsahují tedy genetickou informaci. Tyto informace nejsou pro život

buňky nezbytné. Mohou ovšem obsahovat takovou informaci, která je pro bakterii jistým zvýhodněním, jako je například resistance vůči antibiotikům. Bakterie mohou plazmidy přenášet, a tím pádem tak předávat genetickou informaci, která je v nich obsažena. Tento přenos probíhá buď konjugací (spojení dvou bakterií) nebo transdukci (plazmid je do jiné bakteriální buňky dopraven pomocí bakteriofága).

V cytoplazmě se také nachází tzv. *nepravé jádro*. Není to skutečné buněčné jádro, protože nemá jadernou membránu, která by ho oddělovala od cytoplazmy. Nazýváme ho proto *nukleoid*. Je uložen volně v cytoplazmě a je tvořen bakteriálním chromozomem, který se skládá z jedné molekuly DNA stočené do kruhu.

3.1.4 Bičíky a fimbrie

Fimbrie jsou krátké proteinové brvy na povrchu některých bakterií, které pomáhají k přilnutí bakterie k nějakému povrchu. Mohou mít také zcela specifickou funkci, která napomáhá přilnutí pouze k určitému povrchu.

Bičíky jsou bílkovinná vlákna, schopná kontrakce, a jsou pro bakterie orgánem pohybu. Tento pohyb může být velmi rychlý, může být neřízený nebo může být ovládán chemoreceptory. Obvyklý počet bičků pro jednu buňku je jedna až deset. Tento počet bývá závislý na druhu bakterie, je proto dobrým určujícím znakem. Bičíky se proto někdy v mikroskopickém preparátu zvýrazňují tzv. *stříbřením*. [10]

3.2 Metabolismus bakterií

Metabolismus je souhrn všech přenosů látek a energie. Tyto reakce mohou probíhat uvnitř buňky nebo mezi vnitřním a vnějším prostředím. Umožňují růst a množení bakterií, udržují rovnováhu v buňce. Existují dva typy metabolických procesů – anabolické a katabolické.

Katabolické reakce jsou rozkladné metabolické děje, kdy jsou složité molekuly a struktury štěpeny na menší a jednodušší části. Během těchto procesů se uvolňuje energie, kterou poté může bakteriální buňka využít.

Anabolické reakce jsou takové metabolické děje, při kterých jsou z jednodušších struktur skládány složité molekuly. Pro tyto děje je vždy zapotřebí energie.

Nároky bakterií na živiny jsou vázány na druh. Bakterie lze tedy rozdělit do dvou skupin – autotrofní a heterotrofní.

Autotrofní bakterie tvoří všechny své struktury z anorganických látek. Využívají k tomu oxid uhličitý nebo karbonáty. [13]

Heterotrofní bakterie potřebují ke stavbě svých komponent organické látky, které je potřeba získat z vnějšího prostředí. [13]

Bakterie můžeme také dělit do skupin podle toho, jaké mají nároky na kyslík. Dělíme je na obligátně aerobní, obligátně anaerobní, fakultativně anaerobní, mikroaerofilní a anaerobní aerotolerantní. [14]

Obligátně aerobní bakterie jsou takové, které mohou žít a množit se pouze v přítomnosti dostatečného množství kyslíku.

Obligátně anaerobní bakterie naopak mohou žít a růst pouze za naprosté nepřítomnosti kyslíku, ten je pro ně toxický.

Fakultativně anaerobní bakterie mohou žít za obou uvedených podmínek, tedy za přítomnosti i nepřítomnosti kyslíku.

Mikroaerofilní bakterie jsou takové, pro něž jsou nejpříznivější podmínky k životu při nízkém obsahu kyslíku a naopak velkém množství oxidu uhličitého.

Anaerobní aerotolerantní bakterie mohou žít za přítomnosti kyslíku, ten ovšem ovlivňuje jejich schopnost růstu a množení.

Toto rozdělení podle potřeb kyslíku pro životaschopnost bakterie je důležité, protože díky němu můžeme odhadnout, kde se daný druh bakterie může vyskytovat, a také proto, abychom byli schopni připravit odpovídající podmínky při cílené kultivaci v laboratoři

3.3 Mikrobiální biofilm

Biofilm je zvláštní struktura vytvořená spojením bakterií. Jedná se o bakteriální povlak (společenstvo), které přináší bakteriím mnoho výhod. Tato struktura může vytvářet uvnitř sebe takové prostředí, které je pro bakterie daného druhu vhodné nebo dokonce zcela nezbytné. Biofilm také poskytuje jistou formu ochrany pro bakterie

v něm obsažené, jelikož tato struktura je méně ovlivnitelná vnějšími vlivy. Například v lidském těle jsou bakterie díky biofilmu odolnější vůči lékům a obranným mechanismům lidského těla.

Biofilmy se mohou tvořit na vnějším povrchu, ale i na vhodném vnitřním povrchu. Vyskytují se na různých místech (ve vodárenských filtrech, na kamenných površích, také zubní plak je biofilm). Pro účely této práce je podstatné, že se biofilmy velmi často tvoří také v lidském těle a na řadě lékařských prostředků, jako jsou například implantáty, katétry, kanyly a podobně. [12] V praktické části se budeme zabývat studiem biofilmu, který se vytváří na hadičkách (vybráno bylo několik typů z různých materiálů).

3.3.1 Vznik biofilmu

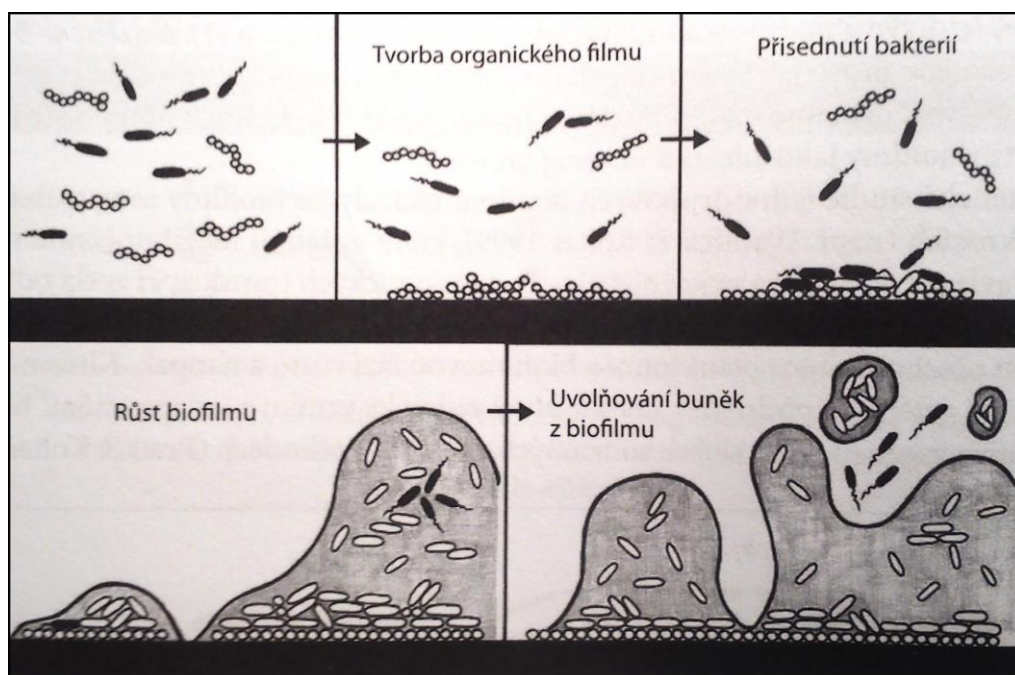
Bakteriální buňka má na svém povrchu struktury, které napomáhají adhezi k různým povrchům. Jedná se především o glykokalyx, ale také některé povrchové proteiny, glykopeptidy, fimbrie. Glykokalyx se může vytvořit na povrchu buňky, jedná se o vlákna polysacharidů, která jsou zakotvena v buněčné stěně. Tato vlákna mají adhezivní funkci, napomáhají buňce k přilnutí k jiným strukturám a povrchům.

Prvním krokem při tvorbě biofilmu je adheze bakterií na povrch struktury, kde bude biofilm vytvářen. Povrch označujeme jako *nosič*. Povrchové struktury buňky, které mají adhezivní schopnosti, přilnou k povrchu nosiče. Tento krok je rozhodující a bývá často kritický. Poté se buňky začnou rozmnožovat a růst, vytváří tak primární biofilm, ke kterému se mohou přichycovat další buňky. Ty mohou být stejného druhu, nebo se může navázat nový mikroorganismus. Přisedáním nových buněk se tvoří sekundární biofilm. Vznik sekundárního biofilmu je o poznání rychlejší, než tvorba primárního. Důvodem je pravděpodobně snadnější přilnutí buněk k již vytvořené vrstvě primárního biofilmu, na rozdíl od první fáze, kdy se buňky musí adaptovat na podmínky prostředí. Tato adaptace je spojená s hydrofobitou nosiče. Pro tvorbu biofilmu je výhodnější hydrofobní povrch. Je prokázáno, že biofilmy se lépe tvoří například na teflonu nebo obecně na plastech, než na skle či kovu. [15]

Dalšími faktory pro tvorbu biofilmu jsou struktura povrchu, jeho pórovitost (buňky se snadněji uchycují na drsném a pórovitém povrchu). Také to, v jakém mediu se tato tvorba odehrává, hraje důležitou roli. Tvorba je samozřejmě rychlejší v takovém mediu, které poskytuje bakteriím dostatek živin.

3.3.2 Růst biofilmu

Další fází je fáze růstu biofilmu, kdy se buňky rozrůstají, diferencují a zrají. Dochází k expresi genů, které napomáhají vzniku biofilmu a mění fyziologii buněk. Během fáze růstu buňky produkují tzv. *sliz*, který je tvořen extracelulární polymerní substancí (EPS). Tato substance je produkována bakteriemi v biofilmu, které jsou do ní poté fixovány. Společně s bakteriemi je EPS základní složkou, která vytváří biofilm. Po určité době se růst biofilmu zpomalí a poté úplně zastaví a biofilm dosahuje určité ustálené tloušťky. Výsledná struktura a velikost biofilmu závisí na zachycování dalších bakterií, možnost růstu závisí na množství vyprodukované EPS, a na odumírání buněk, které může způsobit odpadávání částí biofilmu. [15] Celý tento proces vývoje biofilmu vidíme na Obrázku 2.



Obrázek 2 - Fáze vývoje biofilmu [15]

3.3.3 Stavba biofilmu

Struktura bakteriálního biofilmu závisí na biologických a fyzikálních faktorech, které byly popsány výše, jako například schopnost přizpůsobení se buněk, přenos látek, odtrhávání částí. Biofilmy vytváří svou strukturu také závisle na tom, v jakém prostředí se tvoří, případně jak rychle proudí okolní kapalina, pokud se biofilm tvoří v kapalném prostředí. Biofilmy tvořené ve vysokých průtokových rychlostech jsou hustší a pevnější

(potřebují být odolné vůči proudícímu okolí), nicméně rostou pomaleji, protože snaha o zvýšení odolnosti biofilmu vede k pomalejšímu přenosu látek mezi buňkami. Pro biofilmy je důležitější prvně udržet celistvost a pevnost, poté teprve zajišťují rychlý přenos živin. [15]

Již vytvořený biofilm má heterogenní strukturu. Bakterie jsou rozptýlené v substanci, ve které se vyskytují kanálky naplněné vodou. Není zde žádná pravidelnost, bakterie jsou v této struktuře rozmístěny nahodile. Rostou zde v mikrokoloniích, které mívají obvykle kuželovitý nebo válcový tvar. Tyto mikrokolonie jsou navzájem propojeny již zmíněnými kanálky. Ty slouží jako transportní dráhy pro živiny, nebo mohou fungovat jako jakýsi vylučovací systém pro odvod odpadních látek. Tyto kanálky mohou fungovat jak uvnitř biofilmu, tak mezi jeho vnitřním a vnějším prostředím.

Pórů je největší množství na rozhraní mezi vnitřním prostředím biofilmu a okolním prostředím. Postupně jich ubývá s větší hloubkou, v nejhlubších vrstvách biofilmu se póry již nacházejí ani nemusejí, pak probíhá přenos látek difuzí. Z tohoto důvodu je kyslík v biofilmu nejvíce přítomen v okrajových částech, v hlubokých vrstvách je koncentrace kyslíku nízká, může dokonce docházet k anaerobnímu prostředí a tím tak k odumírání prvotně přisedlého biofilmu. [15]

4 Využití (elektro)magnetického pole v biologii

Tato kapitola se bude věnovat doposud známým účinkům magnetického i elektromagnetického pole v biologii, zejména na mikroorganismy, provedené pokusy, a zjištěné výsledky. Jelikož se jedná o jedno z velmi diskutovaných témat, zda lze (elektro)magnetickým polem ovlivnit živé organismy, tak tato rešerše poslouží k seznámení se s doposud známými informacemi, aby bylo možné usoudit nač a jakým způsobem posléze navazovat v praktické části.

Podle Berga [16], který se zabýval tímto tématem na úrovni buněčné biologie je působení slabého elektrického pole na buňky zcela prokazatelné. Je potřeba měřit frekvenci, amplitudu a dobu působení tohoto pole, aby mohly být tyto hodnoty zohledněny při hodnocení účinků. Výsledky byly hodnoceny podle změn buněčné proliferace, iontového transportu, aktivace několika specifických enzymů (např. Na/K ATPázy, což je enzym, který slouží jako pumpa na buněčné membráně a udržuje gradient sodných a draselných iontů) a zvýšení koncentrace určitých proteinů (napří „*heat shock protein*“, což je skupina proteinů, která je zodpovědná za buněčnou odpověď, při vystavení vysokým teplotám). Na druhou stranu bylo také zjištěno, že výsledky z různých laboratoří se nemusí shodovat, obzvláště pokud bylo použito pole slabší než 0,05 mT. Pravděpodobně z následujících důvodů: rozdíly v postupech (metodikách měření), interference vlnění pokud bylo použito příliš slabé pole, nebo také to, že rozsah měřených parametrů byl příliš malý. Podle Berga tedy, aby výsledky byly hodnotitelné je potřeba použít pole silné minimálně 12 mT, s minimální frekvencí 100 Hz, tímto polem pak působit nejméně dvě hodiny.

Podle článku Adaira [17] studující účinky také na buněčné úrovni, je velmi nepravděpodobné, aby pole menší než 50 μT mělo na buňky účinky. U pole menšího než 5 μT je to pak podle něj již nemožné.

Článek, který byl zpracován třemi německými vědci [18], se již zabýval působením nízkofrekvenčního elektromagnetického pole na různé druhy bakterií. Konkrétně šlo o *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium fischen*. Tyto bakterie byly vystaveny po různě dlouhou dobu účinkům elektromagnetického pole o velikosti 1-10 mT. Výsledky byly ovšem, dá se říci neprůkazné, jelikož byly pozorovány změny vlivem elektromagnetického pole u méně

než čtvrtiny provedených experimentů. Tyto výsledky podporují teorii, že bakterie jsou vůči takto nízkému poli značně odolné.

Studie z roku 2005 shrnuje poznatky působení jak slabých magnetických polí (menší než 1 mT), magnetických polí střední intenzity (1 mT až 1 T), tak i silných magnetických polí (větší než 1 T). Je zde uvedeno, že slabé statické magnetické pole má na bakterii *E. coli* podobné účinky, jako kombinované působení stejnosměrného a střídavého elektrického proudu. Tyto účinky obnášejí změny v chromatinu buňky, závislosti viskozity, změny některých biochemických reakcí v roztoku. Naopak literatura zde tvrdí, že účinky silného pole nejsou prokazatelné. Nejvíce se tento článek věnuje problematice účinků pole střední intenzity. Shrnuje poznatky z předešlých let a dále se věnuje vyšetřování účinků tohoto pole na buněčných kulturách. Říká, že střední intenzity statického magnetického pole mají schopnost ovlivnit řadu biologických systémů, obzvláště pak procesy na buněčné membráně. Tyto změny pak mohou být vratné či trvalé, mohou to být změny funkční nebo změny ve struktuře buňky. Vzhledem k tomu jaké zastává membrána pro buňku funkce, může působení magnetického pole vést ke změně tvaru buňky, uspořádání cytoskeletu, ke změně iontového toku přes membránu, ovlivnění citlivosti receptorů, apod. [19]

Další odborný článek vydaný v roce 2000 popisuje vliv magnetického pole na tři druhy bakterií, kterými byly: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* a opět *Escherichia coli*. Zdrojem pole byly feritové magnety o silách 30, 60, 80 a 100 mT. Účinky pole byly vyhodnocovány pomocí kultivace těchto bakterií a sledování rychlosti jejich růstu. Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že pole zapříčinilo pokles růstu *S. mutans* a *S. aureus*. Ty byly kultivovány v anaerobním prostředí. Počet životaschopných buněk se snižoval s rostoucí silou pole. Tyto účinky ovšem byly považovány za slabé. Dále pak nebyly pozorovány žádné růstové změny u bakterie *E. coli*, která je bakterií fakultativně anaerobní, byla tedy pěstována v aerobních podmínkách. Pro porovnání výsledků byl pozorován také účinek na *S. mutans* v aerobním prostředí. Ani zde nebylo pozorování žádné ovlivnění růstu. Z těchto výsledků lze soudit, že existují rozdíly v účinku magnetického pole na bakterie v závislosti na přítomnosti kyslíku. [20]

Čeští vědci z Akademie věd a Masarykovy univerzity pozorovali účinky nízkofrekvenčních magnetických polí na *E. coli*, kultivovaných na živném agaru, při krátkodobém působení, kratším než 12 minut. Byla použita pole

o indukci 2,7-10 mT. Z této studie vyplývá, že magnetické pole může mít vliv na bakterie *E. coli*. Na základě měření potvrdili, že bakterie tohoto druhu mohou v magnetickém poli růst, nicméně rostou méně než bakterie kultivované v kontrolním vzorku, který nebyl vystaven žádnému poli. Z těchto výsledků usoudili, že magnetické pole zabíjí část bakterií, které mu byly vystaveny. [21]

Další experiment těchto českých vědců se týkal působení pole o indukci 10 mT, které bylo aplikováno na bakterie rodu *Staphylococcus aureus*, *Leclerie adecarboxylata* a opět *Escherichia coli*. Bakterie byly vystaveny magnetickému poli opět 12 minut. Bylo zjištěno, že největší vliv na životaschopnost buněk vykazuje magnetické pole u bakterie *E. coli*, jejichž růst byl tímto polem potlačován. Nejvíce odolným druhem bakterií při tomto pokusu byl *Staphylococcus aureus*. Během tohoto výzkumu byla pozorována tvorba kolonií, přičemž se ukázalo, že magnetické pole má vliv ihned po jeho aplikaci. Je pravděpodobné, že tyto účinky souvisí s ovlivněním iontových kanálů v buněčné membráně. Bylo tedy zjištěno, že magnetické pole snižuje počet bakterií, schopných tvořit kolonie, ovšem nebylo prokázáno, že by magnetické pole bakterie přímo zabíjelo. [22]

Další podobný experiment, provedený nedávno, zkoumal účinky slabého magnetického pole (10 mT) na bakterie *Paracoccus denitrificans* a *Escherichia coli*. Jelikož již bylo známo, že magnetické pole o této indukci způsobuje pokles životaschopnosti bakteriálních buněk, byly v tomto případě pozorovány účinky pole na morfologii bakterií. Byly vybrány tyto dvě bakterie z důvodu jejich tvaru. *E. coli* je tvaru tyčinky, *Paracoccus denitrificans* má tvar kulovitý. Magnetickým polem bylo na bakterie působeno 60 minut. Během toho experimentu nebyly pozorovány jakékoliv změny tvaru bakterií, nebyly také pozorovány žádné změny povrchu. [23]

Článek z loňského roku [24] popisuje vliv statického magnetického pole na bakterie *Escherichia coli* a *Pseudomonas putida*. Tento výzkum probíhal v návaznosti na informace, které tvrdily, že statické magnetické pole zvyšuje účinnost čištění odpadních vod. Výše zmíněné bakterie byly vybrány z důvodu jejich běžného výskytu v aktivovaném kalu (směs obsahující mikroorganismy, nacházející se v odpadní vodě). Bakterie byly tentokrát magnetickému poli vystaveny po dobu 20 hodin a byl sledován jejich růst. Výsledky ukázaly, že oba druhy bakterií byly ovlivněny a to inhibicí jejich růstu. Tyto bakterie byly ovšem pozorovány i dále, po odstranění

magnetického pole. Z výsledků bylo patné, že účinky pole jsou pouze krátkodobé a bakteriím se brzy po odstranění působícího pole navrací jejich schopnost růstu.

Lze říci, že (elektro)magnetické pole působí na živé organismy, nicméně jsou tyto účinky stále nedostatečně prozkoumány a je zde mnoho mezer a otázek, například v porovnání se studiem účinků pole elektrického. Ve většině případů byly pozorovány účinky na životaschopnost a růst bakterií, nebylo ovšem prokázáno že tyto účinky jsou trvalé i po odstranění tohoto pole. Kromě toho také nebylo dokázáno, že by (elektro)magnetické pole zabíjelo bakterie, což se může zdát jako nevýhoda pro účely praktické části této bakalářské práce. Nicméně byly pozorovány účinky, které snižovaly schopnost bakterií tvořit kolonie. Je tedy pravděpodobné, že magnetické pole, bude inhibičně působit také na tvorbu a růst biofilmu, což se pokusíme prokázat v této bakalářské práci.

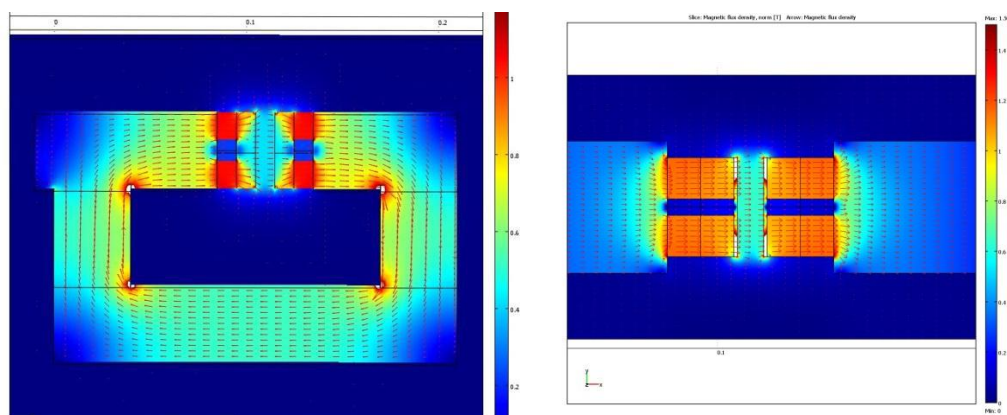
5 Použité magnetické pole

5.1 Zvolená metoda

Statické magnetické pole můžeme vytvořit permanentním magnetem nebo ho vytvořit okolo vodiče protékajícím stejnosměrným elektrickým proudem. Pro naše potřeby je použití pole, vytvářeného proudem nevhodné, jelikož dochází k přílišnému zahřátí vodiče, a také testovaného vzorku. Pro náš experiment jsme tedy zvolili magnetický obvod s neodymovými permanentními magnety. Tyto magnety poskytují nejsilnější pole (vysoké hodnoty magnetické indukce) mezi dosavadními magnety.

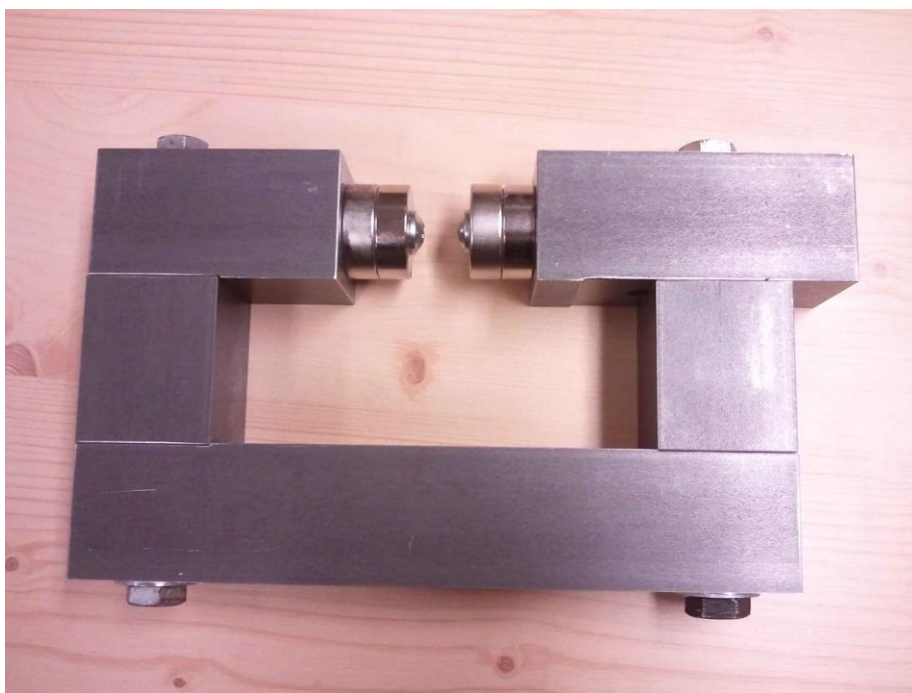
5.2 Použitý přípravek

K vytvoření magnetického pole, kterým bylo působeno na bakteriální biofilm, byly využity dva shodné přípravky. Na jednom z nich byly umístěny čtyři magnety, na druhém z nich pak pouze dva. Přípravek je sestaven ze čtyř (či dvou) neodymových permanentních magnetů, které jsou umístěny na kovové podkově. Ta má volitelně nastavitelnou šířkou štěrbiny. K návrhu magnetického obvodu jsme použili simulační program Comsol Multiphysics. Na Obrázku 3 jsou vyobrazeny výsledky simulace. Při takto zvolené konstrukci, a při mezeře nastavené na 1 cm je magnetická indukce uprostřed vzduchové mezery zhruba 0,6 T.



Obrázek 3 - Počítačová simulace magnetického pole [25]

Vlastní přípravek, který vidíme na následujícím Obrázku 4, se skládá z ocelových hranolů, které jsou spojeny šrouby do tvaru podkovy. Na jejich koncích jsou umístěny neodymové magnety. Takto volená konstrukce umožňuje volitelně nastavitelnou vzduchovou mezeru, do které byl vkládán vzorek, což umožňuje co nejtěsnější obepnutí vzorku. Tedy i co největší možné magnetické pole, jelikož magnetická indukce je tím větší, čím je mezera těsnější.



Obrázek 4 - Kovová podkova s magnety

5.3 Měření indukce

Dalším krokem bylo změření magnetického pole ve štěrbině. K měření byla použita 1D Hallova sonda, která byla připevněna na 2D rameno. Tímto měřicím zařízením lze měřit magnetickou indukci v jedné rovině. Sběr dat a pohyb celého zařízení je zajištěn pomocí A/D převodníků. Měření bylo provedeno pro šířku vzduchové mezery 2mm a pro šířku vzduchové mezery 10mm. 1D Hallova sonda byla vždy umístěna uprostřed vzduchové mezery kolmo na vektor magnetické indukce. [25]

Při malé vzduchové mezeře 2 mm, je magnetická indukce uprostřed roviny $B = -0,45 \text{ T}$. Pro mezeru 10mm je magnetická indukce $B = -0,85 \text{ T}$. Dochází k zeslabování pole. S rostoucí vzdáleností vzduchové mezery se magnetická indukce

snižuje. Odhadem můžeme říci, že lze pole zesílit na hodnotu přibližně 0,4 T při vzduchové mezeře 2 cm. [25]

Bylo zjištěno, že u toho přípravku lze dosáhnout indukce 0,85 T při vzduchové mezeře 2 mm. Vhodné by bylo aplikovat vzorek do co nejmenší vzduchové mezery. To ovšem bylo v našem případě nerealizovatelné, jelikož bylo potřeba vtěsnat do mezery zkumavku se vzorky. Proto se musí volit kompromis mezi vzduchovou mezerou a požadovanou velikostí magnetické indukce. Mezera byla nastavena na nejmenší možnou vzdálenost, aby bylo možné zkumavku do přípravku vsadit (2,8 cm). V našem případě byly využity tyto přípravky dva na sobě. Způsob použití vidíme na obrázku pod textem (Obrázek 5). Takto vytvořené pole je nehomogenní a námi naměřená indukce v tomto přípravku byla 195-240 mT.



Obrázek 5 - Způsob použití přípravků při experimentu

6 Použité bakterie

Pro účely této práce byly vybrány dva bakteriální kmeny, které se liší svou gram pozitivitou/negativitou. Pokusíme se zjistit, jaký je rozdíl v účincích magnetického pole na grampozitivní a gramnegativních bakterie a jak se tento účinek liší.

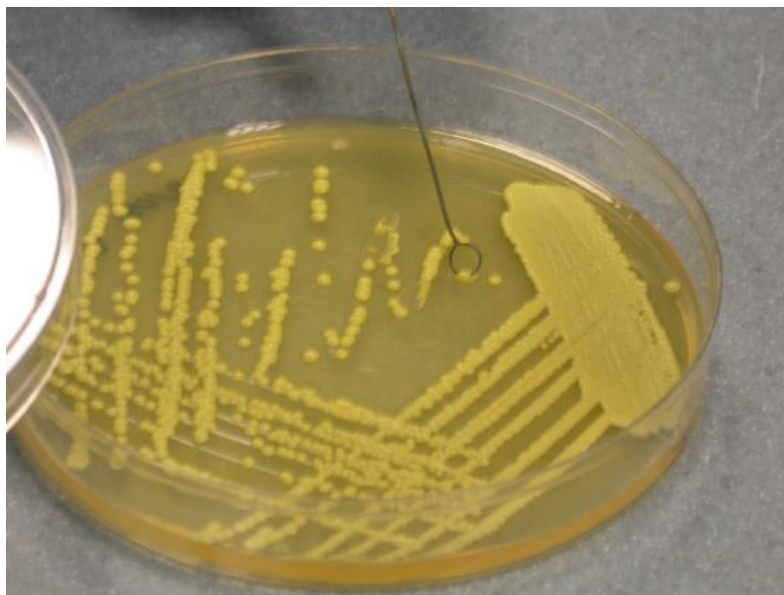
6.1 *Micrococcus luteus*

Jedná se o grampozitivní, striktně aerobní bakterii, kulovitého tvaru, o velikosti 0,9 - 1,8 μm . Patří do čeledi *Micrococcaceae* a do kmene *Actinobacteria*. Jelikož se jedná o kokovitou bakterii, byla původně zařazena mezi streptokoky. Nicméně s postupem času bylo prokázáno, že jsou mikrokoky od stafylokoků značně odlišné, co se týče genomové výbavy, a jsou tedy i vývojově vzdálené a nepatří do stejné čeledi. Liší se také svou potřebou kyslíku, jehož dostatek je u mikrokoků nezbytný k přežití. Tvoří kolonie, které mívají žlutou či kalně oranžovou barvu, což je způsobeno obsahem karotenoidních barviv, které tyto bakterie ochraňují před účinky slunečního záření, konkrétně před jeho ultrafialovou složkou. Bakteriální buňky *Micrococcus luteus* jsou nepohyblivé. Obvykle se shlukují v tetrádách nebo balíčcích.

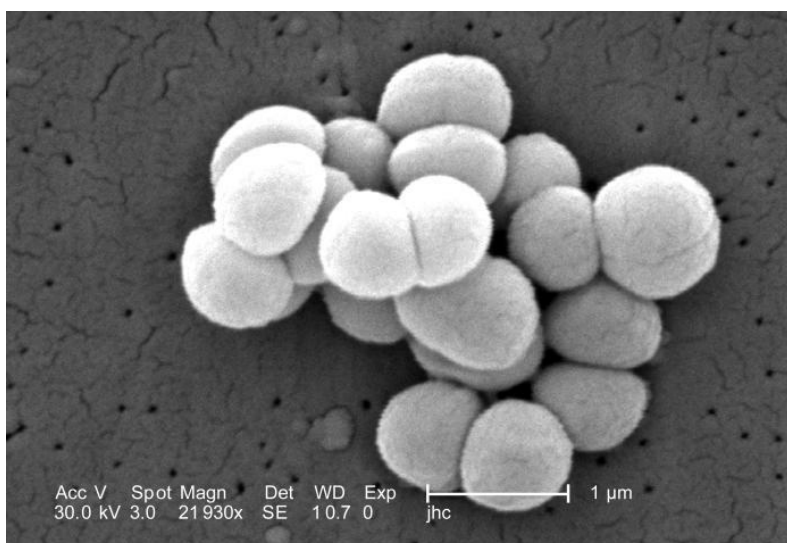
Tyto bakterie se běžně vyskytují v půdě, vodě i ve vzduchu. Kromě toho jsou také přirozenou součástí mikroflóry pokožky a sliznic úst a horních cest dýchacích. Optimální teplota pro jeho růst je 25 - 37°C, čemuž prostředí lidského organismu o běžné teplotě 36°C plně vyhovuje. *Micrococcus luteus* není považován za zdraví škodlivý, pokud se jedná o běžné podmínky. Pokud se najde při kultivačním stěru, bývá obvykle považován za znečištění, nikoli za patogen. Za nestandardních podmínek, či u oslabených pacientů ovšem může vyvolat nepříjemné infekce. V posledních letech se mluví o jeho výskytu jako nosokomiálního patogenu (tzv. nemocniční nákaza, infekce je přímo spojena s hospitalizací pacienta ve zdravotnickém zařízení) u pacientů s oslabenou imunitou, či pacientů s porušenými nebo chybějícími obrannými mechanismy. [26]

Následující dva obrázky ukazují reálné fotografie *Micrococca lutea*. Na první fotografii (Obrázek 6) vidíme vytvořené kolonie po výsevu na Petriho misku

se sójovým agarem. Na druhé fotografii (Obrázek 7) vidíme tuto bakterii pod rastrovacím elektronovým mikroskopem.



Obrázek 6 - *Micrococcus luteus* rozočkovaný na Petriho misce [27]



Obrázek 7 - *M. luteus* vyfocený elektronovým mikroskopem [28]

Pro potřeby této bakalářské práce byl *Micrococcus luteus* izolován přímo z lidské kůže, a to otiskem dlaní. Postup odběru a následné inokulace a kultivace bude popsán v použitých metodách.

6.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli je na rozdíl od *Micrococca lutea* bakterií gramnegativní. Bakterie rodu *E. coli* jsou fakultativně anaerobní, mají tyčinkovitý tvar. Bývají dlouhé zhruba 2 μm , široké přibližně 0,5 μm . Tyto bakterie patří do kmene *Proteobacteria*, čeledi *Enterobacteriaceae*. Enterobakterie jsou běžnými střevními bakteriemi, bývají zpravidla fakultativně anaerobní. Prostředí trávicího traktu je tedy pro ně vhodným místem pro život.

E. coli je součástí běžné střevní mikroflóry člověka. Zastává zde důležitou roli při tvorbě vitamínů B a K, chrání také střevní sliznici před jinými bakteriálními druhy, které by mohly být v tomto prostředí patogeny. *E. coli* osidluje střevo novorozenců dětí během prvních 40 hodin po porodu, většinou bývá první bakterií, která zažívací trakt osídlí. Bakterie přitom zpravidla pocházejí z potravy nebo z osob, které děti ošetřují. [26]

Pokud se *E. coli* nenachází na místech, která pro ni nejsou typická (tzn. mimo střevo), a vyskytuje se pouze v běžném množství, nezpůsobuje žádné potíže. Při přemnožení nebo během výskytu jiných variant (sérotypů), či výskytu na netypických místech může být ovšem zdrojem infekcí. Často zapříčiňuje záněty močových cest, může také způsobovat záněty žlučových cest, meningitidy. Kromě tohoto může také způsobovat infekce ran či sepse. Pokud se následkem porušení celistvosti střeva dostane do břišní dutiny, způsobuje ve většině těchto případů peritonitidu (zánět břišní dutiny). Tento stav je bez včasného lékařského zákroku smrtelný. Terapii lze provést antibiotiky, ovšem studie dokládají, že tato léčba nemusí být vždy účinná, díky získané rezistenci vůči antibiotikům.

Escherichia coli bývá častým původcem průjmu, a to především u malých dětí. Bývá nejčastější příčinou průjemových onemocnění u novorozenců dětí a kojenců, u kterých má infekce velmi rychlý nástup (inkubační doba je 6 – 36 hodin), způsobuje častou stolici s výskytem hlenů a krve, což obvykle vede k dehydrataci. [14]

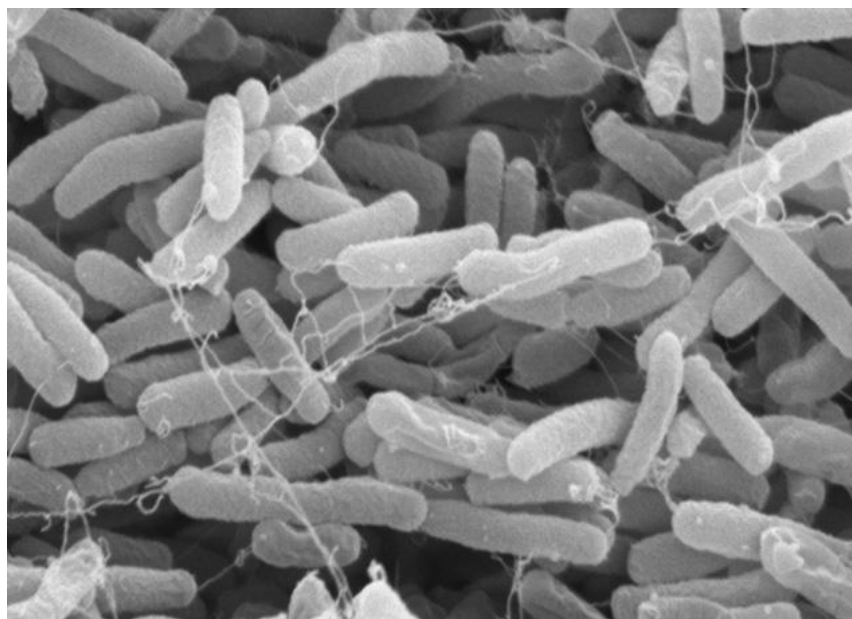
Obvyklými zdroji infekce touto bakterií jsou kontaminovaná voda a potraviny, nedostatečně tepelně zpracované maso, obvykle mleté hovězí, nepasterizované ovocné šťávy, špenát. Zvýšené riziko nákazy je také při cestování, především do rozvojových zemí, nebo také epidemie v jeslích, školkách a školách. [29]

Escherichia coli je jednou z nejlépe prostudovaných bakterií vůbec, proto se také hojně využívá při pokusech v mikrobiologii, k přípravě vakcín a biopreparátů. Jak již bylo popsáno výše, *Escherichia coli* byla také jedním z nejčastěji používaných mikroorganismů při experimentech s působením (elektro)magnetického pole. Pokusíme se proto srovnat vliv magnetického pole na biofilm vytvořený touto bakterií, u níž byl vliv na bakteriální buňky již několikrát pozorován, s vlivem tohoto pole na biofilm *Micrococca lutea*, jehož interakce s magnetickým polem není prozkoumána.

Následující fotografie zobrazují, jak vypadá *Escherichia coli* při rozočkování na Petriho misku (Obrázek 8) a při detailním pohledu rastrovacím elektronovým mikroskopem (Obrázek 9).



Obrázek 8 - *E. coli* na Petriho misce [30]



Obrázek 9 - E.coli vyfocena elektronovým mikroskopem [31]

Pro naše účely byla bakterie *Escherichia coli* rozočkována z čisté kultury, objednané z České sbírky mikroorganismů na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity. Další postupy inokulace, růstu a nasazení budou přesněji popsány dále.

7 Použité materiály a metody

V této kapitole budou shrnuty a popsány metody a postupy, které byly využity pro přípravu, průběh a vyhodnocení experimentu v této bakalářské práci.

7.1 Izolace a pomnožení bakterií

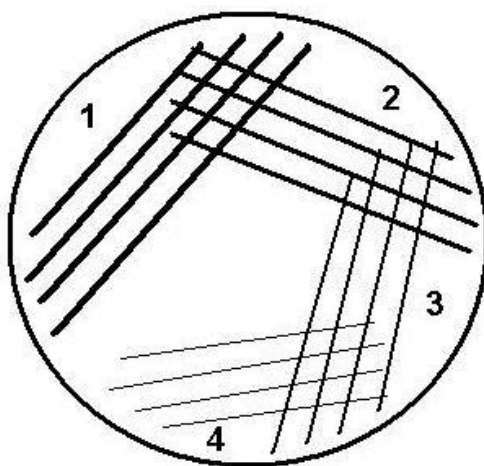
Micrococcus luteus byl pro náš experiment izolován otiskem z lidské pokožky na krevní agar v Petriho misce. Odběr probíhal v laboratoři mikrobiologie Technické univerzity v Liberci. Odběr byl proveden otiskem kožní plochy na dlaních několika osob, dlaně před odběrem omyty ani desinfikovány nebyly, aby bylo zachováno největší možné množství mikroorganismů. Petriho miska byla ponechána v termoboxu po dobu 3 dnů při teplotě 37 °C. Na Petriho misce na krevním agaru vyrostla veškerá přirozená mikroflóra, která se na pokožce vyskytuje. Jelikož *Micrococcus luteus* je přirozenou, nikoli však nezbytnou, součástí mikroflóry pokožky, objevil se na kultivačním nálezu pouze u několika osob. *Micrococcus luteus* tvoří na krevním agaru jasně žluté kolonie, které jsou nezaměnitelné s jinými mikroorganismy. Následně byly z Petriho misky mikrobiologickou kličkou odebrány pouze žluté kolonie *Micrococca lutea*, které byly dále rozočkovány na další krevní agar a kultivovány opět při 37 °C. Takto izolovaný *M. luteus* byl poté inokulován do Erlenmayerovy baňky se sójovým bujónem.

Escherichia coli byla při našem experimentu nanášena na Petriho misky s živným agarem přímo z čisté kultury. Následně byla rozmnožena na živném agaru při 37 °C po dobu 3 dnů, poté byla inokulována do sójového bujónu. Tyto směsi již byly přímo použity pro testy s magnetickým polem.

Pro naočkování a dobrý růst kultur námi zvolených bakterií byl použit živný agar, konkrétně *Plate count Agar*, Biorad ČR. Tento agar je v podstatě masopeptonový bujón, do kterého je přidán sušený extrakt z mořské řasy Agar agar. Přidává se zpravidla 1,5-2 % tohoto extraktu. V dnešní době je již agar součástí směsi určité půdy, která se naváží na potřebné množství udávané výrobcem, doplní se destilovanou vodou, zamíchá a nechá se nabobtnat. Směs se poté rozvaří a ještě horká se nalije do Petriho misek

a nechá se zchladnout. Během zchladnutí tato směs ztuhne a živný agar je připraven k naočkování bakterií.

Na takto připravený živný agar byly naočkovány námi zvolené bakterie, jejichž získání bylo popsáno výše. Nanášení probíhalo pomocí sterilizované bakteriologické kličky, která byla vysterilizována plamenem. Vychladlou kličkou byl poté nabrán vzorek odebrané bakterie. Vzorek byl naočkován na živnou půdu pomocí několika dlouhých tahů kličkou na zhruba čtvrtinu plochy agaru. Poté byla klička opět opálена plamenem a po jejím vychladnutí se rozetřel již nanesený materiál do další čtvrtiny plochy agaru. Toto bylo opakováno ještě dvakrát, poté byla živná půda zcela zaplněna. Při této technice je třeba dát pozor, aby se poslední roztíraný materiál nedotkl počátečních čar. Tento postup byl proveden jak u *Micrococca lutea*, tak u *Escherichie coli* stejně. Je znázorněn na Obrázku 10 Takto naočkované bakterie se nechaly růst po dobu 3 dnů v termoboxu, při teplotě 37°C.



Obrázek 10 - Rozočkování na kultivační půdu

7.2 Vytvoření inokula

Po 3 dnech kultivace byly bakteriální kolonie obou bakterií odebrány a bylo vytvořeno inokulum v tekuté živné půdě. Odběr proběhl opět za pomoci plamenem opálené mikrobiologické kličky, kterou se provedl opatrně stěr dostatečného množství narostlých kultur. Klička byla poté vložena do baňky s tekutou živnou půdou a zachycené kultury byly rozetřeny na stěnu baňky. Ta byla poté pečlivě promíchána, aby se bakterie v médiu rozptýlily. Tento postup byl opakován několikrát.

Tekuté živné půdy jsou roztoky, které obsahují živiny a růstové faktory potřebné pro růst a množení bakterií. V našem případě byl použit sójový bujón. Jeho příprava je obdobná jako v případě živného agaru. Použije se navážené množství směsi doporučené výrobcem, smíchá se s destilovanou vodou, nechá se rozpustit a nakonec se vysterilizuje v autoklávu. Takto připravený sójový bujón je vhodným tekutým kultivačním médiem pro vznik a růst nejen bakterií a jejich kolonií, ale také pro vznik a růst mikrobiálního biofilmu. V našem případě bylo vytvořené inokulum v tomto bujónu ponecháno 48 hodin. Bylo uchováno v termoboxu při teplotě 37°C. Tekuté živné médium bylo v našem experimentu zvoleno proto, že jsme se pokusili vytvořit biofilm na malých nosičích, vložených do zkumavky. Z tohoto důvodu nebylo vhodné použít pevný živný agar.

7.3 Vlastní experiment s magnetickým polem

Pro oba druhy bakterií byl použit tentýž postup při experimentu, abychom mohli vyloučit pokud možno všechny ostatní vlivy, které by mohly rozdíly v růstu biofilmu ovlivnit.

Dále byly pro experiment vybrány čtyři typy nosičů, jejichž přesný popis bude uveden níže. Jednalo se o čtyři různé typy hadiček, které byly vysterilizovány promytím v etanolu a vyzářeny UV světlem, poté byly v UV boxu nastříhány na stejně dlouhé díly (1 cm), vidíme na Obrázku 11. Nastříhání probíhalo v UV boxu, z důvodu zachování aseptického prostředí, za použití sterilních nůžek, aby nedošlo ke kontaminaci nosičů jinými druhy bakterií. Od každého druhu hadičky bylo připraveno 20 kusů, z nichž vždy 10 bylo použito do zkoumaného vzorku, na který bylo působeno magnetickým polem,

zbylých 10 bylo umístěno do kontrolního slepého vzorku, který sloužil ke srovnání (hodnocení růstu bakterií bez ovlivnění magnetickým polem).



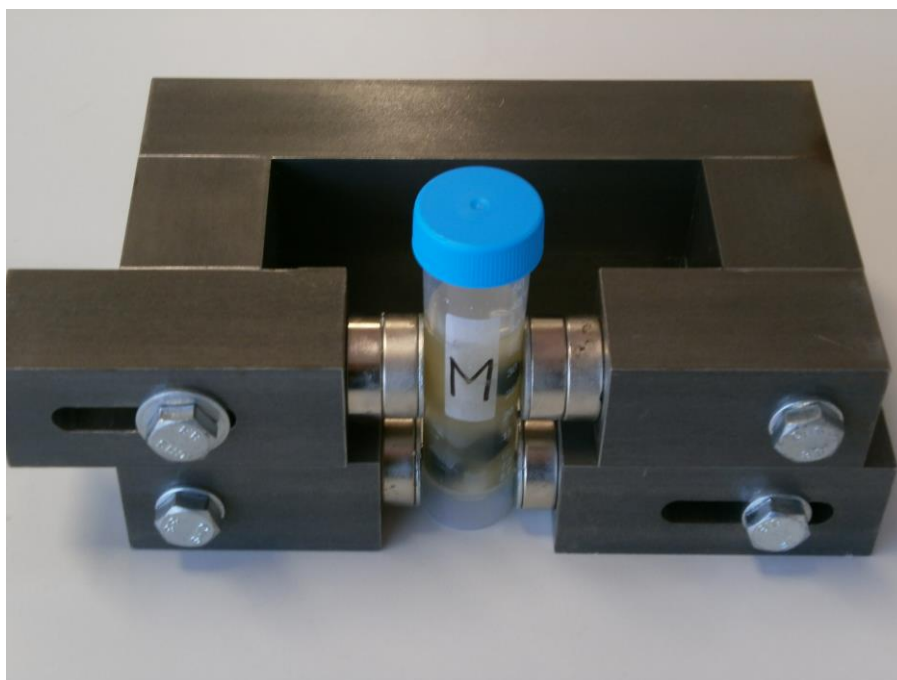
Obrázek 11 - Nastříhané nosiče

Takto připravené nosiče byly umístěny do velké plastové sterilní uzavíratelné zkumavky (tzv. *falkonky*). Do každé zkumavky se umístilo od každého typu nosiče 10 kusů, dohromady tedy 40 kusů nosičů. Ty byly do zkumavek umístěny nerovnoměrně, tedy tak, aby netvořily ve zkumavce vrstvy podle typu nosiče. Do takto připravené zkumavky bylo poté nalito námi připravené inokulum v sójovém bujónu. Toto bylo provedeno tak, aby obsah optimálně odpovídal našim potřebám, tedy, aby veškeré nosiče byly ponořeny, a zároveň aby hladina nebyla příliš vysoko a nepřesahovala tak působíště magnetického pole.

Hadičky byly společně s inokulem umístěny ve zkumavce za účelem vytvoření mikrobiálního biofilmu na jejich povrchu. Při vyhodnocení výsledků bude také posouzeno, jestli je rozdíl v úchytu biofilmu na různé povrchy nosičů (hadičky). Byly připraveny dvě naprosto totožné zkumavky, se stejným obsahem inokula, i se stejným počtem hadiček. Jedna zkumavka pak byla označena velkým písmenem M (magnet) a byla vložena do magnetického pole. Druhá zkumavka, označena písmeny SL (slepý vzorek), byla umístěna samostatně, v dostatečné vzdálenosti od permanentního magnetu, aby byl vyloučen jakýkoliv účinek magnetického pole na tento vzorek. Tento vzorek sloužil jako takzvaný kontrolní vzorek k hodnocení růstu biofilmu bez vlivu

magnetického pole. Způsob uložení zkumavky se vzorkem v magnetickém poli vidíme na obrázku níže (Obrázek 12).

Pokus byl u *Micrococca lutea* i u *Escherichie coli* prováděn po dobu tří týdnů při laboratorní teplotě 22°C. Dvakrát týdně probíhala výměna jedné čtvrtiny sójového bujónu s bakteriemi, která byla vždy nahrazena čerstvým sójovým bujónem, aby byl podpořen růst bakterií. Čtvrtina starého bujónu byla odpipetována sterilní pipetou. Následně stejný objem, který byl ze zkumavky odebrán, byl doplněn novým. Aby nedošlo k nechtěné kontaminaci, bylo potřeba okraje baňky, ve které bylo inokulum uchováváno, sterilizovat plamenem před tím, než z ní byl doplněn chybějící objem ve zkumavce. Poté byly zkumavky dobře promíchány a opět umístěny (do magnetu a mimo něj).



Obrázek 12 - Způsob uložení vzorku do magnetu

Zkumavky byly pravidelně dvakrát denně promíchávány a provzdušňovány. Po dvou týdnech od nasazení byly odebrány nosiče. Od každého typu byly z každé zkumavky odebrány 4 kusy. Ty byly pak následně zpracovány a vyhodnoceny metodami a postupy, uvedenými dále.

Po třech týdnech byl experiment ukončen a byly odebrány zbylé vzorky. Čtyři z nich od každého typu byly využity pro vyhodnocení experimentu. V každé zkumavce byly navíc od každého typu dva nosiče, které sloužily jako záložní pro případ, že by se

něco pokazilo (např. během manipulace by byl vzorek znehodnocen, kontaminován, ztracen). Vzorky, které nebyly zpracovány ihned, byly uchovány v chladicím boxu při teplotě 5 °C.

7.4 Použité nosiče

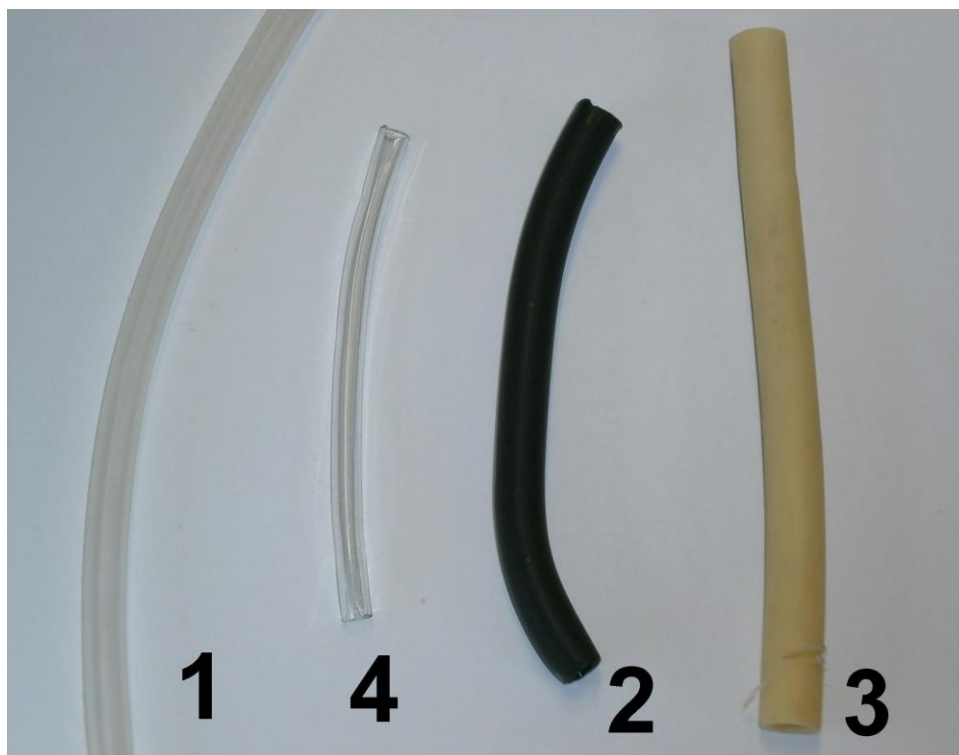
Pro vlastní experiment byly použity čtyři typy hadiček, které byly upraveny výše popsaným postupem. Hadičky byly zvoleny jako nosiče pro bakteriální biofilmy z toho důvodu, že se na nich biofilmy často tvoří. Zároveň jsou hadičky velmi hojně využívaným prostředkem ve zdravotnictví. Na konci této práce bude tedy zhodnoceno, zda by bylo působení magnetickým polem vhodnou variantou, jak zamezit vytváření mikrobiálního biofilmu na podobných částech zdravotnických prostředků, ať už se jedná o různé hadičky, katétry, či spojovací zařízení, které by mohly být vytvořeným biofilmem znehodnoceny. Bude také posouzeno, zda a jak záleží na materiálu použité hadičky

Silikonová hadička tlustá – Tato hadice byla pro naše potřeby objednána od firmy Fisher Scientific, jedná se o transparentní silikonovou hadičku o vnitřním průměru 6 mm a vnějším průměru 7 mm. Hadice pochází od výrobce Deutsch&Neumann GmbH, má teplotní stálost -60 až 200°C. Vidíme ji na obrázku níže, jedná se o hadičku č. 1 (Obrázek 13).

Teflonová hadička černá – Další hadice byla objednána taktéž od firmy Fisher Scientific a pochází od výrobce Deutsch&Neumann GmbH. Jedná se o hadičku s vnitřním průměrem 6 mm a vnějším průměrem 10 mm. Je vyrobena z teflonu (polytetrafluorethylen), je černé barvy a má vysokou chemickou odolnost vůči kapalinám a plynům. Vidíme ji na Obrázku 13, hadička č. 2.

Marprene hadička žlutá - Další typ použité hadičky byla Marprene od firmy Watson Marlow, což je speciální termoplastický elastomer, vyrobený touto firmou. Jedná se o materiál s vysokou odolností vůči chemikáliím, snášející teploty až do 80°C. Hadička má vnitřní průměr 8 mm a vnější průměr 12 mm. Barva je mléčně žlutá. Hadička je na Obrázku 13 označena číslem 3.

Silikonová hadička tenká - Poslední použitý typ hadičky byl objednáán od firmy Jezírka Brno, která se sice nezabývá přímo laboratorní technikou a příslušenstvím, nicméně dodává hadičky vhodné pro použití v kapalinách. V našem případě byla použita silikonová vzduchovací hadička, průhledná, o vnitřním průměru 4 mm, vnějším průměru 6 mm od výrobce Tripond. Na Obrázku 13 pod číslem 4.



Obrázek 13 - Použité hadičky

S těmito povrchy se setkáváme velmi často také ve zdravotnictví. Silikon je častým materiálem dýchacích vaků, infuzních setů, odsávacích zařízení, apod. Teflon je nepřilnavý materiál, a proto se používají teflonové katetry např. pro invazivní měření krevního tlaku. Jsou z něj také vyrobeny membrány různých senzorů, atd. Marprene materiál se ve zdravotnictví využívá u pump s vysokým průtokem, např. u peristaltických pump, mimotělního oběhu a dalších. [32]

8 Vyhodnocení

8.1 Zpracování vzorků

Následuje popis, jak bylo s odebranými vzorky naloženo, aby mohly být vyhodnoceny výsledky.

Celkově bylo odebráno osm zkumavek se vzorky. Zkumavka se vzorky po dvoutýdenním působení magnetickým polem, zkumavka po dvou týdnech se slepým vzorkem (kontrolní vzorek, který nebyl vystaven mag. poli), zkumavka na konci experimentu, tedy po třech týdnech, se slepým vzorkem, i zkumavka po třítýdenním působení magnetickým polem. Takto byly odebrány vzorky jak u *Micrococca lutea*, tak u *Escherichie coli*. Celkově tedy osm zkumavek. Z každé zkumavky se vzorky byl od každého nosiče odebrán jeden vzorek, který byl zpracován a vyfocen pod mikroskopem.

Z každé zkumavky byly od každého typu nosiče odebrány tři kusy. Ty byly vloženy do skleněné zkumavky s kovovým víkem, v nichž bylo 10 ml fyziologického roztoku. Takto připravená zkumavka se umístila do třepačky, kde byla ponechána po dobu dvou minut. Cílem bylo vytřepat veškerý biofilm vytvořený na nosičích do fyziologického roztoku. Po vytřepání se odebral 1 ml fyziologického roztoku s vytřepanými bakteriemi (1. ředění, celkově jde o ředění 10x) a ten byl vylit na Petriho misku a zavařen do živného agaru. Následně byl odebrán 1 ml stejného roztoku, a ten byl nalit do další zkumavky, kde se nacházelo 9 ml čistého fyziologického roztoku. Vznikl tedy nový roztok, který měl opět objem 10 ml (2. ředění, celkově jde o ředění 100x). Ten byl promíchán na třepačce po dobu 10 s, aby došlo k rovnoměrnému rozptýlení vzorku v roztoku. Z tohoto nově vzniklého roztoku byl opět odebrán 1 ml, který byl vylit na Petriho misku a zavařen do živného roztoku, a 1 ml, který byl nalit do další zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku. Vznikl další roztok (3. ředění, celkově jde o ředění 1000x). Tento postup byl opakován až do 4. ředění (celkově jde o ředění 10000x). Pro přehled je seznam vzorků uveden v Tabulce 1 a Tabulce 2. Od každého uvedeného vzorku byla vytvořena tato čtyři ředění.

Tabulka 1 - Vzorky *Micrococcus luteus*

po 2 týdnech – slepý vzorek	Teflonový nosič	Marprenenosič	Silikonový nosič tenký	Silikonový nosič tlustý
po 3 týdnech – slepý vzorek	Teflonový nosič	Marprenenosič	Silikonový nosič tenký	Silikonový nosič tlustý
po 2 týdnech – vzorek z magnetu	Teflonový nosič	Marprenenosič	Silikonový nosič tenký	Silikonový nosič tlustý
po 3 týdnech - vzorek z magnetu	Teflonový nosič	Marprenenosič	Silikonový nosič tenký	Silikonový nosič tlustý

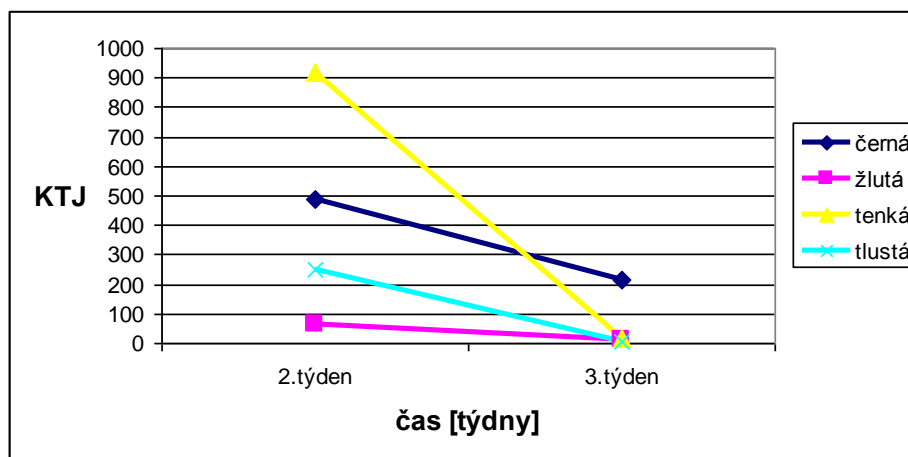
Tabulka 2 - Vzorky *Escherichia coli*

po 2 týdnech – slepý vzorek	Teflonový nosič	Marprenenosič	Silikonový nosič tenký	Silikonový nosič tlustý
po 3 týdnech – slepý vzorek	Teflonový nosič	Marprenenosič	Silikonový nosič tenký	Silikonový nosič tlustý
po 2 týdnech – vzorek z magnetu	Teflonový nosič	Marprenenosič	Silikonový nosič tenký	Silikonový nosič tlustý
po 3 týdnech - vzorek z magnetu	Teflonový nosič	Marprenenosič	Silikonový nosič tenký	Silikonový nosič tlustý

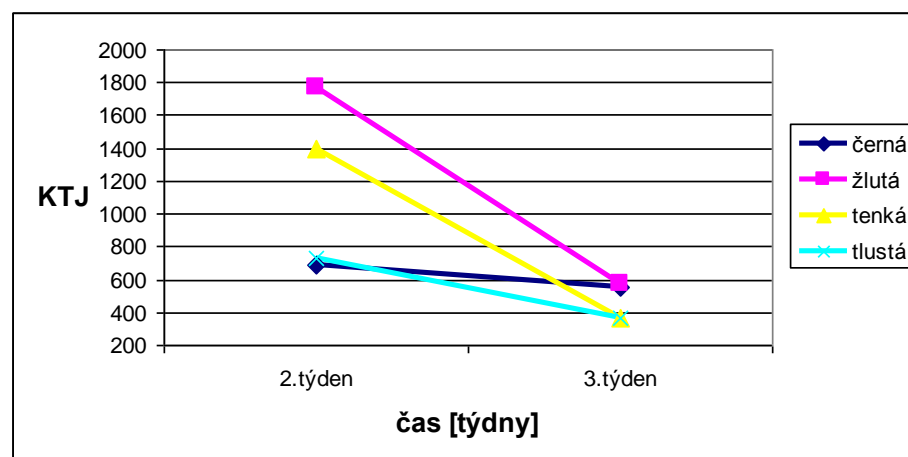
Celkově bylo tedy připraveno 128 zkumavek s různě rozředěnými vzorky, které byly napipetovány na Petriho misky a zality živným agarem. Během celého experimentu byly dodrženy aseptické podmínky práce. Petriho misky byly uchovány po dobu tří dnů v termoboxu, jehož vnitřní teplota byla 37°C. Zde se nechaly růst vytřepané (a zředěné) bakterie. Následně byly spočítány kolonie tvořící jednotky (KTJ) na každé Petriho misce, od každého vzorku byly vytvořeny čtyři misky (1. - 4. ředění). Poté byly zprůměrovány hodnoty těchto čtyř ředění pro každý vzorek.

8.2 Výsledky

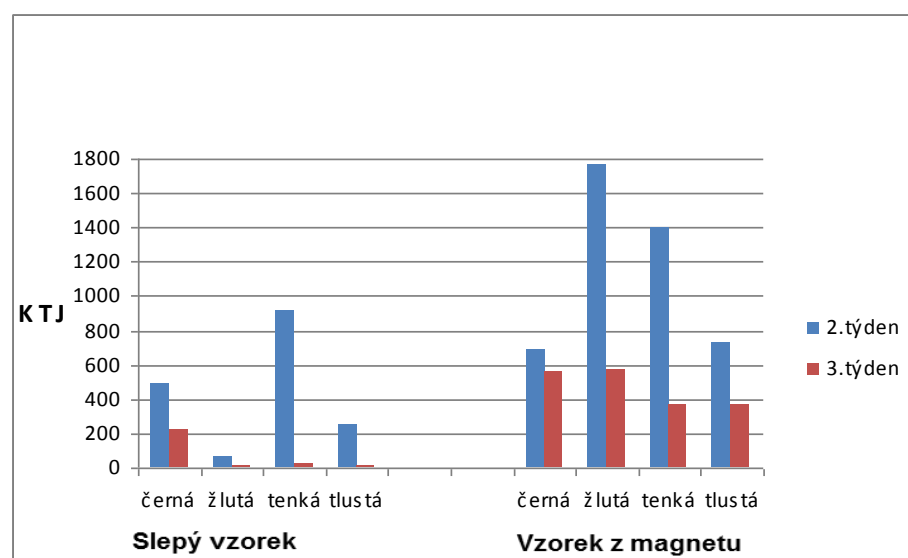
Naměřené výsledky byly zpracovány do grafů nejprve tak, aby dobře znázorňovaly závislost v čase, tedy aby byly vidět rozdíly v odběrech po dvou týdnech a po třech týdnech, a také rozdíly v růstu podle typu nosiče. Výsledky pro bakterii *Micrococcus luteus* jsou zobrazeny na Grafu 1 a Grafu 2. Na Grafu 3 vidíme rozdíly mezi slepým vzorkem a vzorkem z magnetu.



Graf 1 - M. luteus - slepý vzorek



Graf 2- M. luteus - vzorek z magnetu

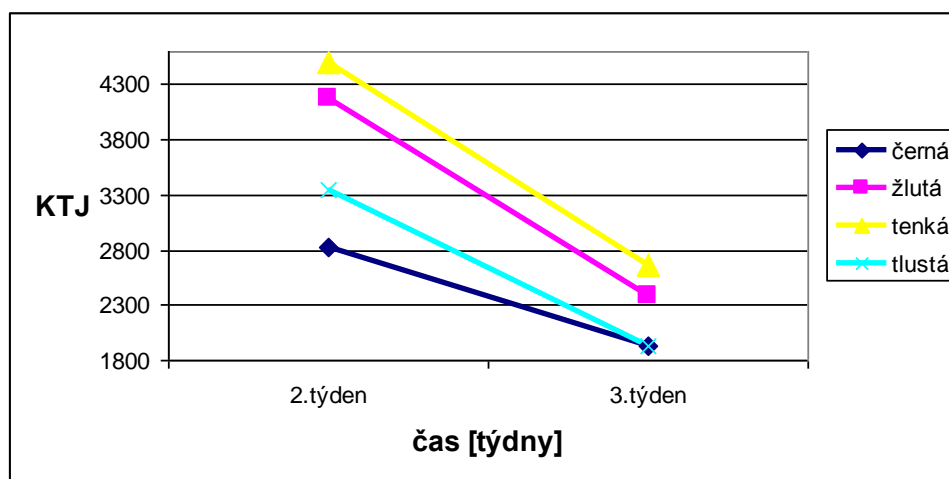


Graf 3 - M. luteus - porovnání slepého vzorku a vzorku z magnetu

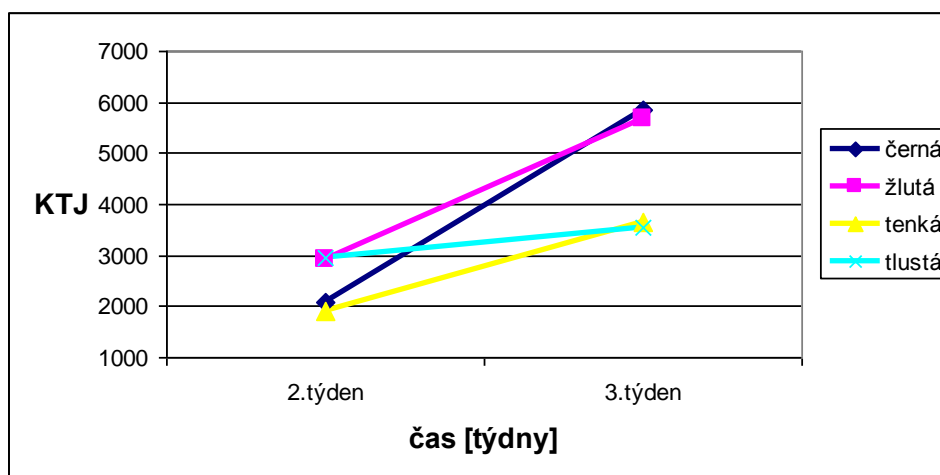
Z grafů je patrné, že množství biofilmu (přepočteno na KTJ) se snižovalo u všech vzorků, bez ohledu na to, zda byl vzorek vystaven působení pole, či nikoli. Stejně tak se snížilo množství biofilmu na všech typech hadiček. Nicméně počty KTJ ve druhém týdnu byly vždy vyšší ve vzorku, který byl vystaven magnetickému poli, na rozdíl od slepého vzorku. Z těchto výsledků lze usuzovat, že magnetické pole má na růst biofilmu pozitivní vliv a podporuje jeho růst v počátečních fázích vývoje. Následný odběr po třech týdnech ukázal pokles u obou vzorků přibližně ve stejné míře, z čehož lze soudit, že na udržení biofilmu nemá toto pole již přílišný vliv.

Z výsledků lze také usuzovat, že magnetické pole může měnit schopnost bakteriálních buněk přichytit se k různým povrchům. Zatímco ve slepém vzorku se biofilm vytvořil ve velmi malé míře na žluté marprenové hadičce, ve vzorku z magnetu se naopak ukázal tento materiál jako nejvýhodnější pro tvorbu biofilmu. V obou případech lze považovat tenkou silikonovou hadičku jako vhodnou pro vznik biofilmu, naopak silikonovou tlustší hadičku je možné označit za nejméně vhodný nosič pro biofilm.

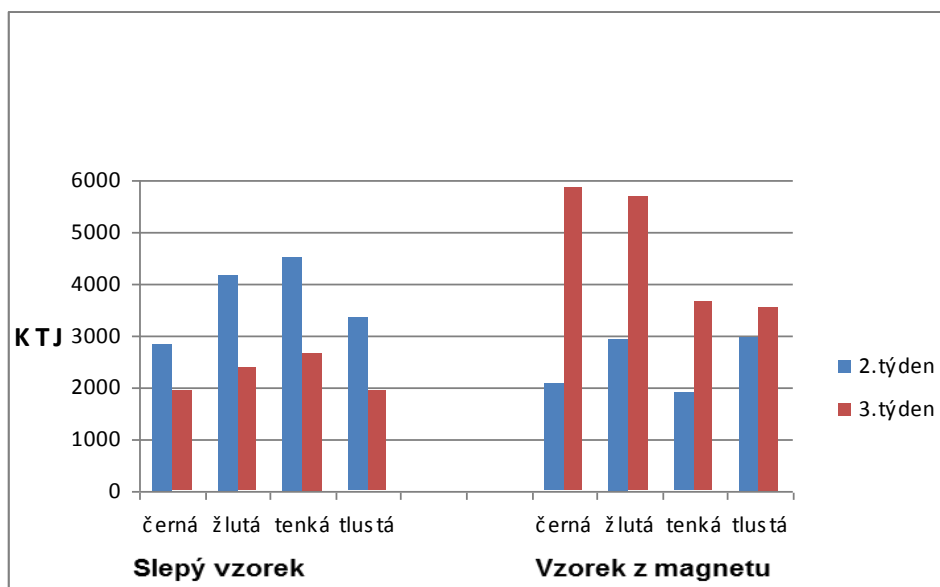
Výsledky pro bakterii *Escherichia coli* vidíme na Grafu 4, Grafu 5 a Grafu 6.



Graf 4 - *E. coli* - slepý vzorek



Graf 5 - *E. coli* - vzorek z magnetu



Graf 6 - *E. coli* - porovnání slepého vzorku a vzorku z magnetu

Z grafů lze soudit, že magnetické pole má u této bakterie rozdílný vliv v počátečních a pozdějších fázích vývoje. Nárůst biofilmu byl v prvních dvou týdnech vždy vyšší na stejném typu nosiče ve slepém vzorku, což poukazuje na fakt, že v počátečních fázích má magnetické pole negativní vliv na bakterie rodu *E. coli*. To také potvrzují studie zmíněné výše. Nicméně v těchto studiích nebylo působeno na bakterie déle než dva týdny. Při našem pokusu se ukázalo, že po třech týdnech došlo na všech nosičích ve slepém vzorku k prudkému poklesu. Na rozdíl od toho ve vzorku z magnetu, kde byl původně menší nárůst biofilmu, došlo k vysokému růstu. U třech nosičů ze čtyř byl tento nárůst více než dvojnásobný. Tento fakt podporuje domněnku, že magnetické pole má opět pozitivní účinky na růst biofilmu, ale to až ve třetím týdnu.

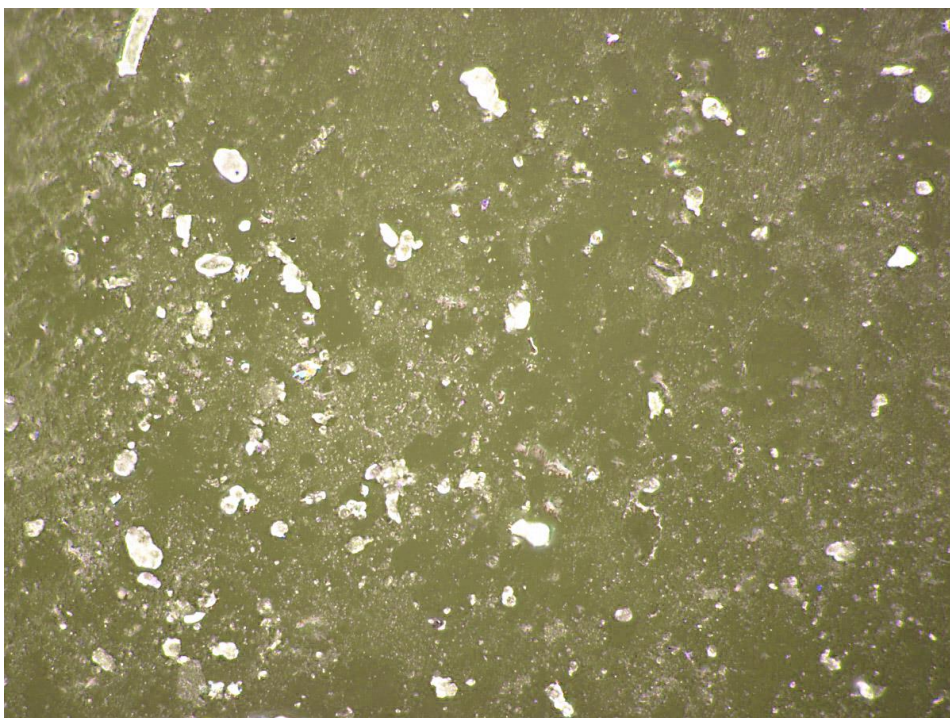
Také v tomto případě lze pozorovat změny u adherentních schopností buněk. Rozdíl je nejvíce patrný u tenké silikonové hadičky, u které se zdá, že magnetické pole změnilo schopnost přichycení se k povrchu, a to negativně. Za nejméně vhodný nosič lze opět označit tlustší silikonovou hadičku. Je to tedy nejvhodnější povrch pro použití v biomedicině, jelikož zde je biofilm nežádoucí. Nicméně všechny námi testované materiály jsou hojně využívány v medicíně, a jejich použití závisí i na jiných kritériích, než je přichycování bakterií. Není tedy možné zavrhnout nějaký materiál pouze na základě těchto poznatků. Lze ovšem doporučit dodržování dostatečné vzdálenosti od zdrojů magnetického pole, pokud jsou tyto materiály použity.

Z výše zmíněného je tedy možné soudit, že magnetické pole má rozdílné účinky na gram-pozitivní a gram-negativní bakterie. V obou případech magnetické pole podporovalo růst biofilmu, nicméně u gram-pozitivního *Micrococca* ovlivnilo toto pole růst spíše v počátečních fázích, zatímco u gram-negativní *E. coli* mělo velký vliv až později, kdy došlo k jeho velkému nárůstu.

Pro názornou ukázkou byly pod mikroskopem oba biofilmy zdokumentovány. Na Obrázku 14 vidíme biofilm bakterie *E. coli*, a na Obrázku 15 pak biofilm *M. lutea*.



Obrázek 14 - Biofilm *E. coli* pod mikroskopem



Obrázek 15 - Biofilm *M. luteus* pod mikroskopem

9 Závěr

Lze konstatovat, že cíle práce byly splněny. Byl pozorován vliv magnetického pole, generovaným permanentními magnety, na mikrobiální biofilm bakterie rodu *Escherichia coli* a na mikrobiální biofilm bakterie rodu *Micrococcus luteus*. Tyto dva druhy bakterií se liší svou gram-pozitivitou/negativitou. Biofilm byl vytvořen na několika typech nosičů, a byla porovnána souvislost se schopností tvořit biofilm na různých materiálech.

Magnetické pole mělo v obou dvou případech pozitivní vliv na tvorbu a růst biofilmu. Byl pozorován rozdíl v účincích na biofilm tvořený grampozitivním *Micrococcem*, kde byl růst biofilmu podpořen působením magnetického pole v počátečních fázích, a gramnegativní *E. coli*, kde byl vliv magnetického pole patrný až v později odebraném vzorku. Z výsledků práce lze také usuzovat, že magnetické pole může mít vliv na adherentní schopnosti bakterií, které se pod vlivem tohoto pole uchycovaly na dané typy nosičů rozdílně.

Z dosažených výsledků nelze tvořit komplexní závěry, výsledky se týkají pouze námi provedených experimentů. Nicméně fakt, že u obou pokusů došlo vlivem magnetického pole k podpoření růstu biofilmu, poukazuje na to, že využití magnetického pole, generovaného permanentními magnety, ve snaze potlačit vznik či růst biofilmu, nebo zničit již vytvořený biofilm, je pro biomedicínu nevhodný. Lze doporučit, aby byla věnována jistá opatrnost při používání zdrojů magnetického pole v blízkosti přístrojů nebo částí medicínských přístrojů a prostředků, jelikož zde může být podporován růst biofilmu. Ten ve zdravotnictví představuje závažný problém, jelikož jsou biofilmy zdroji obtížně odstranitelných infekcí. Mikrobiální biofilmy se často tvoří například na katetrech, cévkách, umělých srdečních chlopních, kloubních náhradách, kardiostimulátorech, a podobně. Představují pak zvýšené riziko a je tedy dobré se jejich vzniku vyvarovat. Z tohoto důvodu lze doporučit nepoužívat zdroje magnetického pole v blízkosti těchto a jim podobných prostředků a zařízení. Naopak by se tento poznatek dal využít například v procesech čištění vod, které jsou založené na aktivitě bakteriálních společenstev.

Jako další postup lze navrhnout opakování těchto experimentů pro další bakteriální kmeny, aby bylo možné lépe posoudit rozdíly v působení magnetického pole na gramnegativní a grampozitivní bakterie. Velice vhodné by bylo také vyhodnotit vliv působení pole v různém čase (krátkodobé či dlouhodobé působení). Při dalších pokusech lze také využít točivé magnetické pole, či vysokofrekvenční magnetické pole. Zajímavým pokračujícím experimentem by také bylo pozorování vlivu magnetického pole na lidské tkáně.

Soupis bibliografických citací

- [1] SMĚKAL, P. Teorie elektromagnetického pole. 1. vyd. Ostrava : Pedagog. fak., 1988. 276 s.
- [2] MYSLÍK, J. Elektromagnetické pole : základy teorie. 1. vyd. Praha : BEN, 1998. 159 s. ISBN 80-86056-43-0.
- [3] BROŽ, J. Elektřina a magnetismus II.. 1.vyd. Praha : SPN, 1975. 233 s.
- [4] KNEPPO, L. Magnetické pole. 1.vyd. Bratislava : Slovenské vydav. technickej literatúry, 1955. 159 s.
- [5] SEDLÁK, B, ŠTOLL, I. Elektřina a magnetismus. 2.vyd. Praha: ACADEMIA, 2002. 632 s. ISBN 80-200-1004-1.
- [6] HAŇKA, L. Teorie elektromagnetického pole. 2. přeprac.vyd. Praha: SNTL, 1982. 218 s. ISBN 0450682.
- [7] BUREŠ, J. PETRÁŇ, M. ZACHAR, Jozef. Electrophysiological methods in biological research. 1. vyd. Praha : ČSAV, 1960. 515 s.
- [8] KATO, M. Electromagnetics in Biology, Hicom, Japan: Springer 2006, ISBN-13 978-4-431-27913-6.
- [9] VALUCH, J. Magnetismus jako podmínka života a zdraví. 1. vyd. Praha : Metramedia, 2000. 116 s. ISBN 80-238-5886-6.
- [10] KAPRÁLEK, F. Základy bakteriologie. 1. vyd. Praha : Karolinum, 1999. 241 s. ISBN 80-7184-811-5.
- [11] RYŠKOVÁ, O. Základy lékařské mikrobiologie a imunologie. 1. vyd. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2007. 130 s. ISBN 80-246-0135-4.
- [12] JULÁK, J. Úvod do lékařské bakteriologie. 1. vyd. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2006. 404 s. ISBN-80-246-1270-4.
- [13] KITTNAR, E. CHALOUPECKÝ, Vladimír. HEJZLAR, Miroslav. Základy lékařské mikrobiologie : Bakteriální metabolismus - Kultivace bakterií - Genetika bakterií a virů. 1. vyd. Praha : SNTL, 1986. 114 s.
- [14] RICHTER, J. Mikrobiologie, imunologie a epidemiologie. 1. vyd. Praha : Scientia Medica, 1996. 64 s. ISBN-80-85526-54-9.
- [15] RULÍK, M. a kol. Mikrobiální biofilmy. 1. vyd. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2011. 447 s. ISBN 978-80-244-2747-8

- [16] BERG, H. Problems of weak electromagnetic field effects in cell biology. [online]. [citováno dne 2013-04-09]. Dostupné z adresy: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0302459899000124
- [17] ADAIR, R. Hypothetical biophysical mechanisms for the action of weak low frequency electromagnetic fields at the cellular level. [online]. 1997 [citováno dne 2013-04-09]. Dostupné z adresy: www.scopus.com/record/display.url?eid=2-s2.0-0030730846&origin=inward&txGid=4491A24A01883B452078A2C5D605D4A1.y7ESLndDIIsN8cE7qwvy6w%3a1
- [18] MITTENZWAY, R., a kol. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on bacteria—the question of a co-stressing factor. [online]. 1996 [citováno dne 2013-04-09]. Dostupné z adresy: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0302459895005048
- [19] DINI, L., Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. [online]. 2005 [citováno dne 2013-04-09]. Dostupné z adresy: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432805000090
- [20] KOHNO, M., a kol. Effect of static magnetic fields on bacteria: Streptococcus mutans, Staphylococcus aureus, and Escherichia coli. [online]. 2000 [citováno dne 2013-04-09]. Dostupné z adresy: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928468000000420
- [21] STRAŠÁK, L., a kol. Effects of low-frequency magnetic fields on bacteria Escherichia coli. [online]. 2002 [citováno dne 2013-04-09]. Dostupné z adresy: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539401001529
- [22] FOJT, L., a kol. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria Escherichia coli, Leclercia adecarboxylata and Staphylococcus aureus. [online]. 2004 [citováno dne 2013-04-09]. Dostupné z adresy: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539404000611
- [23] FOJT, L., a kol. 50 Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria. [online]. 2009 [citováno dne 2013-04-09]. Dostupné z adresy: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432809000936
- [24] FILIPÍČ, J., a kol. Effects of low-density static magnetic fields on the growth and activities of wastewater bacteria Escherichia coli and Pseudomonas putida. [online]. 2012 [citováno dne 2013-04-09]. Dostupné z adresy: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412009273#
- [25] Konzultace s Ing. Martinem Truhlářem, Ph.D, Liberec, Leden-Duben 2013
- [26] PHARMA-REPORTS. Klinicky významné bakterie. 1. Vyd. Praha : Triton, 2012. 123 s. ISBN 978-80-7387-588-6.

- [27] MMU Microbiology Services. [online] [citováno dne 2013-03-27]. Dostupné z adresy:
www.hsri.mmu.ac.uk/microbiology/education_and_communication/resources/images2.asp#/microbiology/images/free/rev/micrococcus_luteus.jpg
- [28] Microbe World. [online] [citováno dne 2013-03-27]. Dostupné z adresy:
www.microbeworld.org/component/jlibrary/?view=article&id=8054
- [29] CAREY, R. SCHUSTER, M. MCGOWAN, K. Lékařská mikrobiologie v klinických případech. 1.vyd. Praha : Triton, 2011. 321 s. ISBN 978-80-7387-480-3.
- [30] Truman State University. [online] [citováno dne 2013-03-27]. Dostupné z adresy:
jherrera.sites.truman.edu/escherichia-coli/
- [31] The Well Known Microbe: E. coli. [online] [citováno dne 2013-03-27]. Dostupné z adresy: <http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/zah0700.html>
- [32] Konzultace s Ing. Janem Suchomelem, Praha, Duben 2013

Seznam příloh

Příloha A

- 1. Graf pro teflonový nosič, *M. luteus*
- 2. Graf pro marprene nosič, *M. luteus*
- 3. Graf pro tenký silikonový nosič, *M. luteus*
- 4. Graf pro tlustý silikonový nosič, *M. luteus*

Příloha B

- 1. Graf pro teflonový nosič, *E. coli*
- 2. Graf pro marprene nosič, *E. coli*
- 3. Graf pro tenký silikonový nosič, *E. coli*
- 4. Graf pro tlustý silikonový nosič, *E. coli*

Příloha C

- 1. Fotografie z mikroskopu, *M. luteus*, teflonový nosič
- 2. Fotografie z mikroskopu, *M. luteus*, marprene nosič
- 3. Fotografie z mikroskopu, *M. luteus*, tenký silikonový nosič
- 4. Fotografie z mikroskopu, *M. luteus*, tlustý silikonový nosič

Příloha D

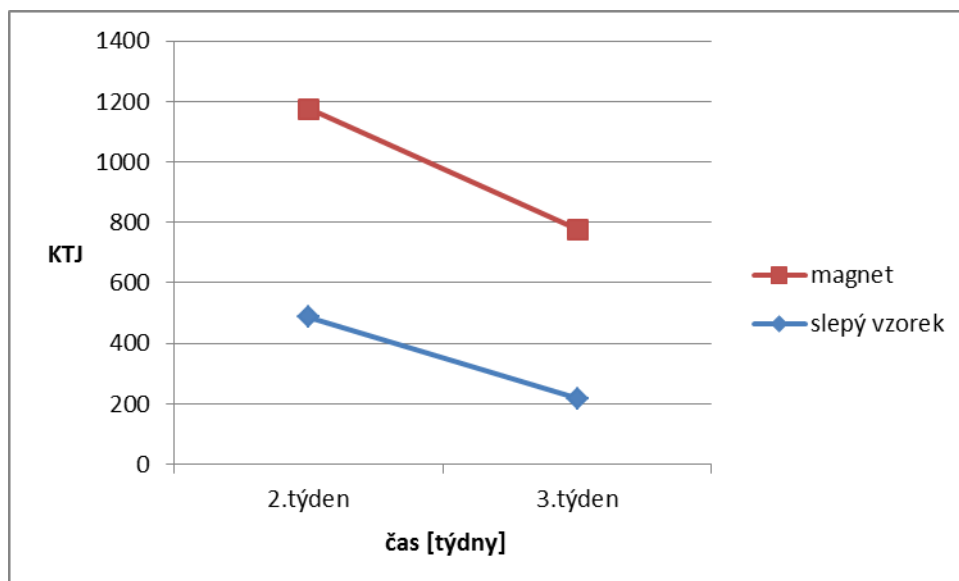
- 1. Fotografie z mikroskopu, *E. coli*, teflonový nosič
- 2. Fotografie z mikroskopu, *E. coli*, marprene nosič
- 3. Fotografie z mikroskopu, *E. coli*, tenký silikonový nosič
- 4. Fotografie z mikroskopu, *E. coli*, tlustý silikonový nosič

Příloha E

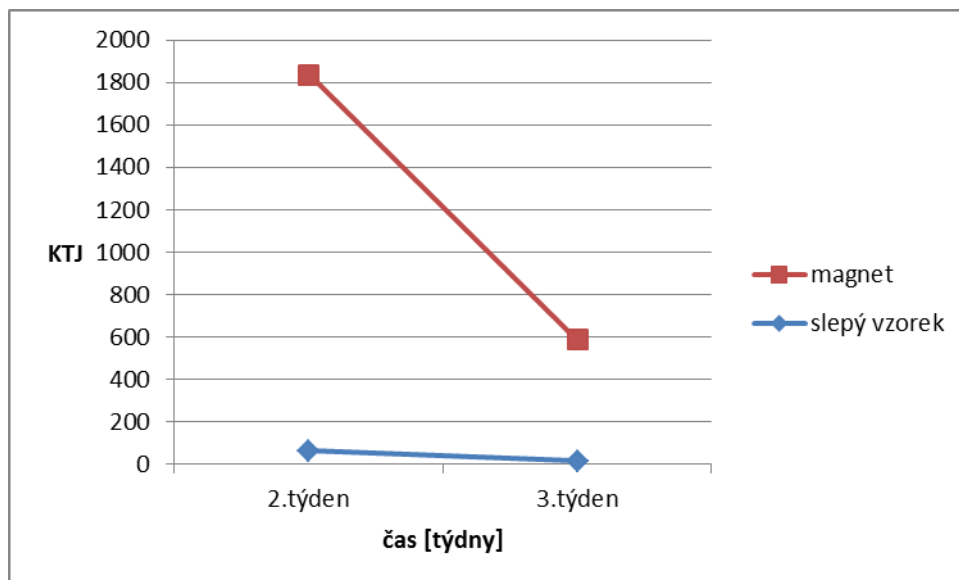
- 1. Fotografie z mikroskopu, *E. coli*, teflonový nosič
- 2. Fotografie z mikroskopu, *E. coli*, marprene nosič
- 3. Fotografie z mikroskopu, *E. coli*, tenký silikonový nosič
- 4. Fotografie z mikroskopu, *E. coli*, tlustý silikonový nosič

Příloha A

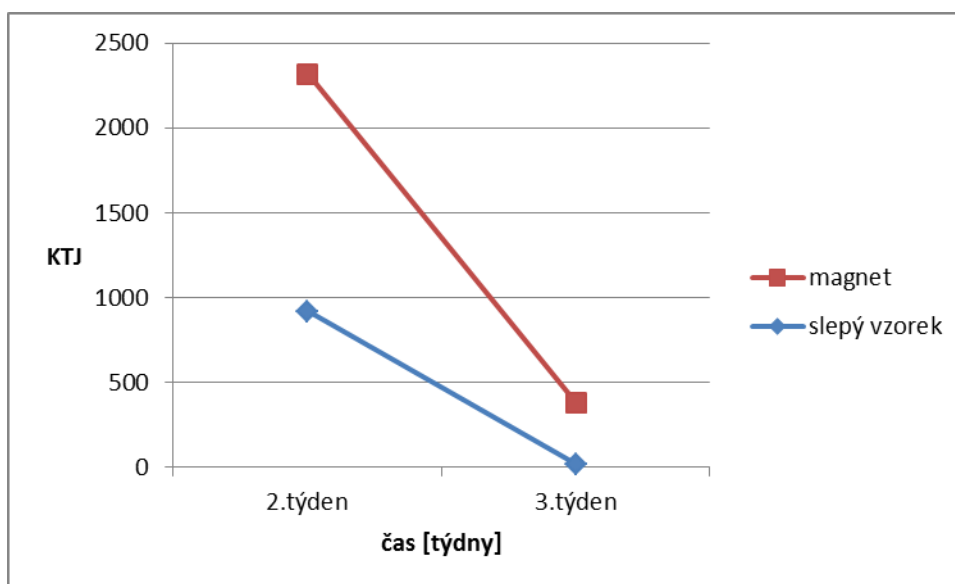
1. Graf pro teflonový nosič, *M. luteus*



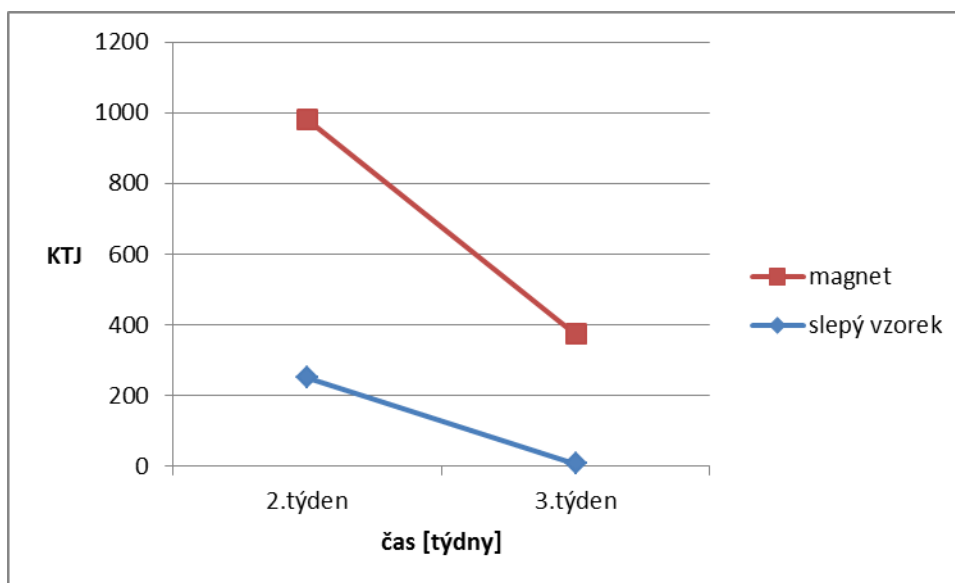
2. Graf pro marprene nosič, *M. luteus*



3. Graf pro tenký silikonový nosič, *M. luteus*

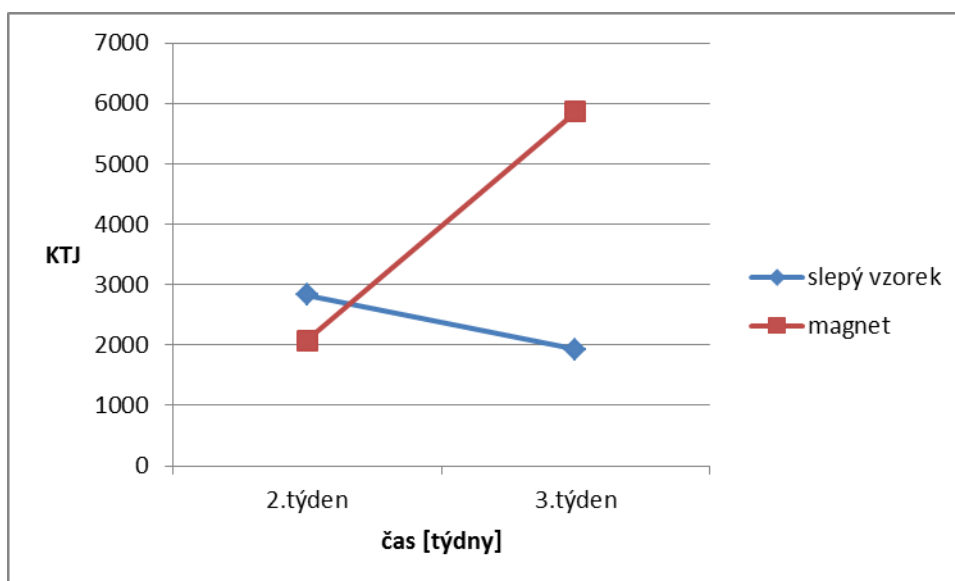


4. Graf pro tlustý silikonový nosič, *M. luteus*

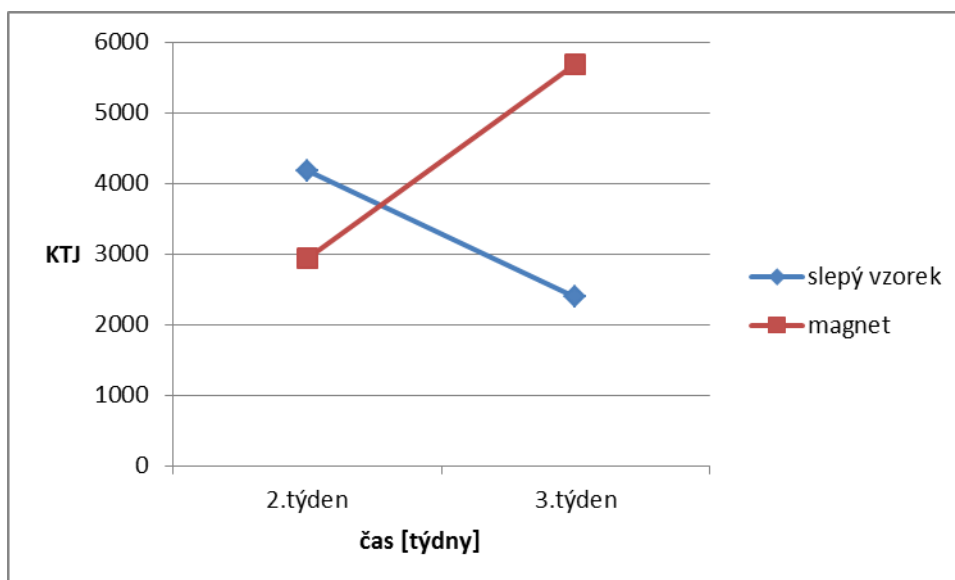


Příloha B

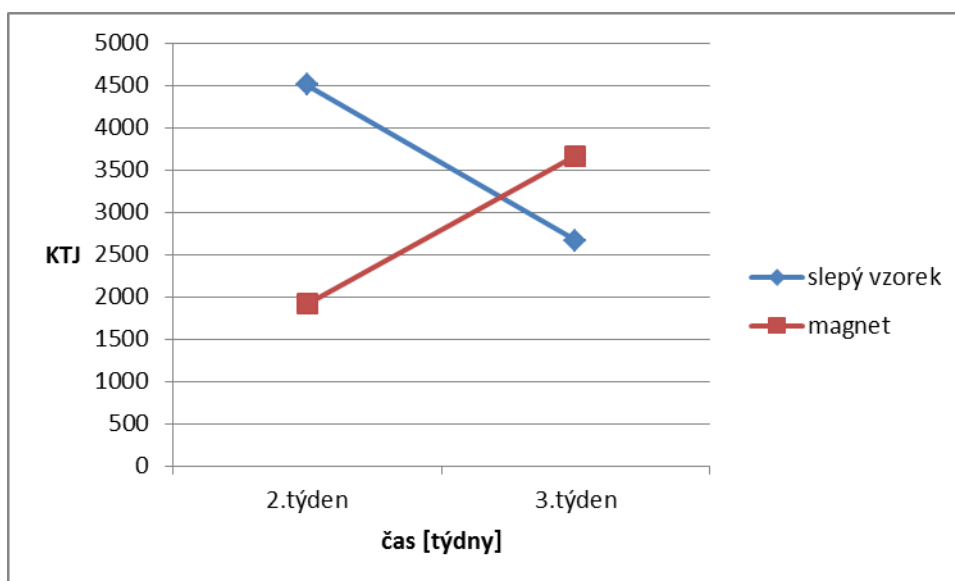
1. Graf pro teflonový nosič, E. coli



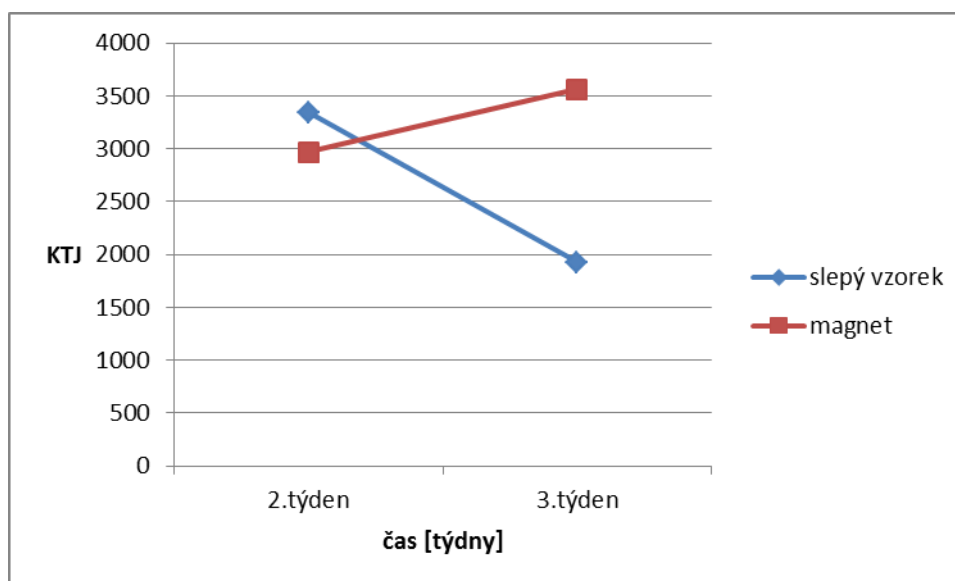
2. Graf pro marprene nosič, E. coli



3. Graf pro tenký silikonový nosič, E. coli



4. Graf pro tlustý silikonový nosič, E. coli



Příloha C

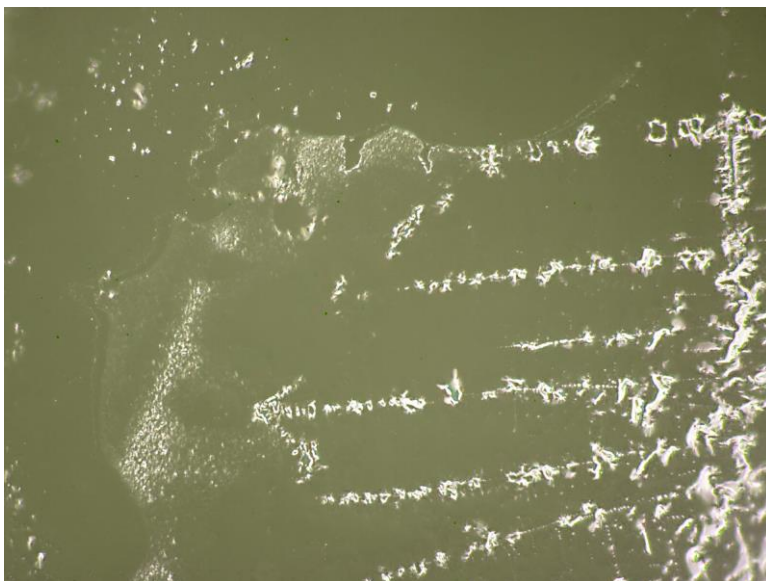
1. Fotografie z mikroskopu, *M. luteus*, teflonový nosič



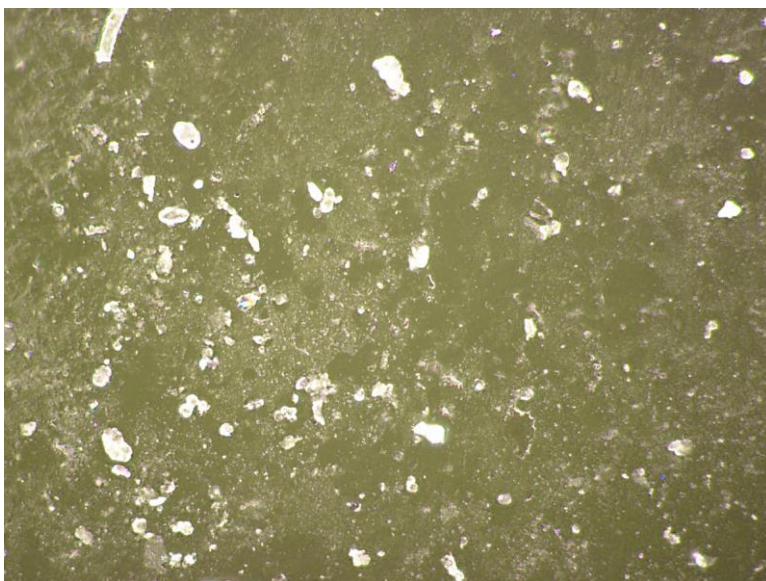
2. Fotografie z mikroskopu, *M. luteus*, marprene nosič



3. Fotografie z mikroskopu, *M. luteus*, tenký silikonový nosič



4. Fotografie z mikroskopu, *M. luteus*, tlustý silikonový nosič



Příloha D

1. Fotografie z mikroskopu, E. coli, teflonový nosič



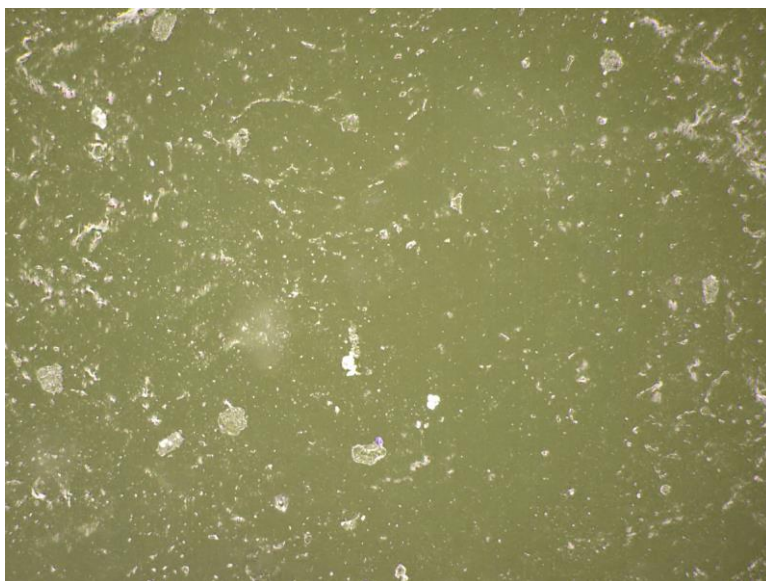
2. Fotografie z mikroskopu, E. coli, marprene nosič



3. Fotografie z mikroskopu, E. coli, tenký silikonový nosič

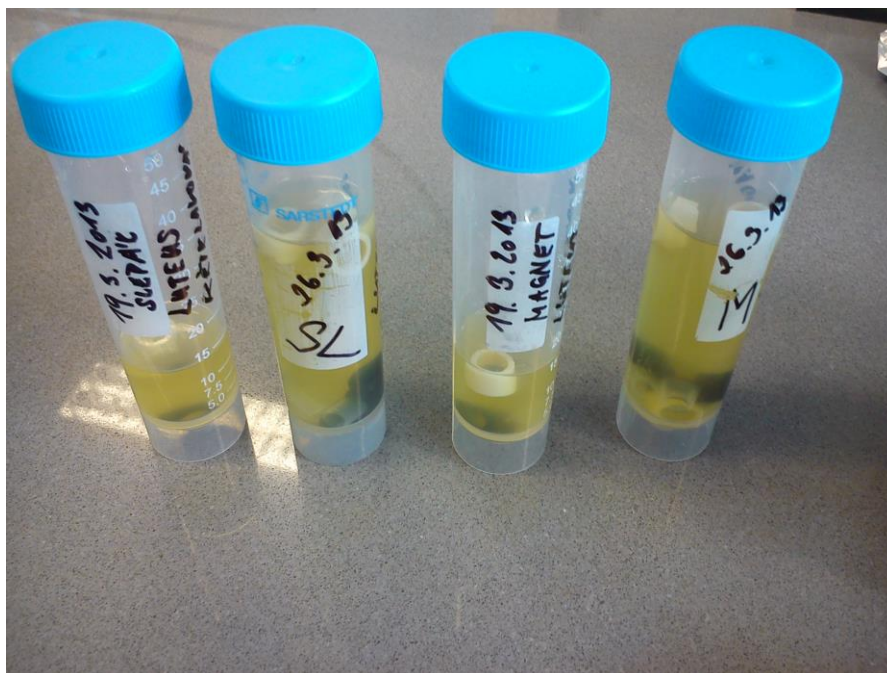


4. Fotografie z mikroskopu, E. coli, tlustý silikonový nosič

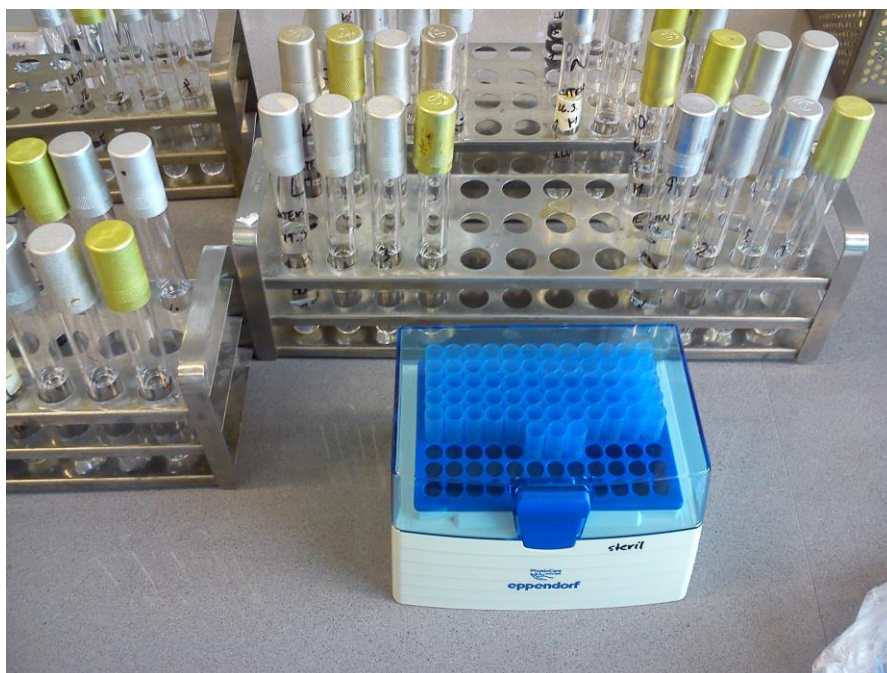


Příloha E

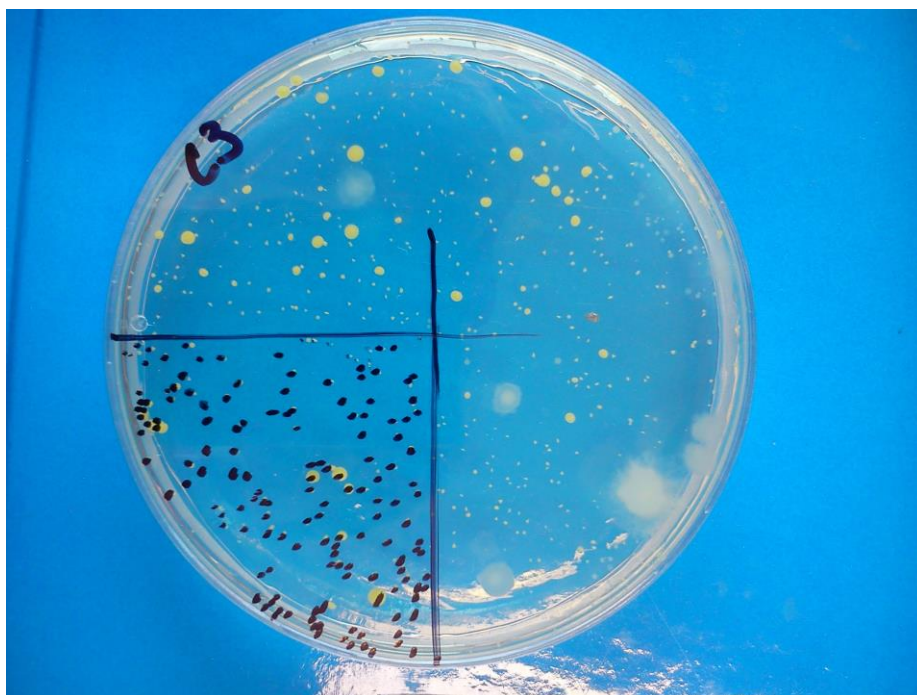
1. Fotografie – vzorky *M. luteus*



2. Fotografie – průběh ředění vzorků



3. Fotografie – ukázka počítání KTJ



4. Fotografie – průběh vyhodnocování vzorků

